

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: PROFESSOR DR. MED. H. K. MÜLLER-HERMELINK

**Die Rolle von NFAT-Transkriptionsfaktoren
bei der Regulation der Apoptose
peripherer T-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
THOMAS KÖNIG
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2006

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: PROFESSOR DR. MED. H. K. MÜLLER-HERMELINK

**Die Rolle von NFAT-Transkriptionsfaktoren
bei der Regulation der Apoptose
peripherer T-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
THOMAS KÖNIG
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2006

Referent: PROF. DR. DR. EDGAR SERFLING

Koreferent: PRIV.-DOZ. DR. CHRISTIAN KNEITZ

Dekan: PROF. DR. GEORG ERTL

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2007

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Grundlagen	1
1.1	Apoptose als Form des Zelltodes	2
1.1.1	Auslösemechanismen	3
1.1.2	Regulation und Ablauf des AICD in T-Helfer-Zellen	5
1.2	Grundlegendes über NFAT-Transkriptionsfaktoren	8
1.2.1	Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren	8
1.2.2	Der Phänotyp NFAT-defizienter-Mäuse	9
1.2.3	NFAT-Faktoren und AICD	11
1.3	Problemstellung dieser Arbeit	12
2	Design des Experiments	14
3	Ergebnisse	18
3.1	Auswertungskriterien	19
3.2	NFAT-Defizienz hemmt die CD3-vermittelte Apoptose	21
3.2.1	Quantitative Betrachtungen	21
3.2.2	Signifikanz der Aussagen	27
3.3	NFAT und AICD korrelieren quantitativ miteinander	28
3.3.1	Bereinigung um die spontane Apoptoserate	28
3.3.2	Vergleich mit dem NFAT-Gehalt der Zellen	30
4	Diskussion	33
4.1	Spezifische Aspekte der durchgeführten Experimente	33
4.1.1	Unterschied der spontanen Apoptoserate	33
4.1.2	Gleiche Apoptoseraten bei Einfach- und Doppelt-k.o.-Mäusen	34
4.2	Allgemeine Aspekte bezüglich der Methodik	37

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.1	(Un-)Mittelbarkeit der Wirkung des NFAT-Mangels	37
4.2.2	Beschränkte Gültigkeit des Modellsystems	38
4.3	Beziehung zum Gesamtbild des AICD	39
4.3.1	Implikationen der Proportionalität	39
4.3.2	Das Geflecht der Signalwege	42
4.4	Ausblick	44
5	Zusammenfassung	45
A	Ergänzungen	47
A.1	Details der (In-)Aktivierung von T-Helfer-Zellen	47
A.2	Vergleichbarkeit trotz unterschiedlicher Spontanraten	50
A.3	Abschätzung des relativen NFAT-Gehaltes der Zellen	52
A.4	Messwerttabelle und Fehlerrechnung	54
B	Material und Methoden	57
B.1	Material	57
B.1.1	Gerätschaften	57
B.1.2	Verbrauchsmaterialien	58
B.1.3	Reagenzien	58
B.1.4	Lösungen, Puffer und Nährmedien	59
B.1.5	Antikörper	61
B.1.6	Zellen	61
B.1.7	Hersteller und Vertreiber	61
B.2	Methoden	63
B.2.1	Gewinnung und Aufreinigung der CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	63
B.2.2	Stimulation und Expansion	63
B.2.3	Induktion und Messung der Apoptose	64
C	Abkürzungsverzeichnis	66
	Literaturverzeichnis	70

Kapitel 1

Einleitung und Grundlagen

Sam Keyser war erst zehn Monate alt, da erfuhren seine Eltern, dass er Leukämie hatte. Seine Schwester Wendy – noch keine vier Jahre alt – begriff, dass ihr Brüderchen eines Tages sterben würde. Ihre Mutter konnte von Anfang an offen mit ihr darüber sprechen. Sie hat diese Zwiegespräche in einem Tagebuch aufgezeichnet:

“Seit dem Rückfall wirken die Medikament nicht mehr. Ich sage Wendy, dass Sam bald sterben wird. Dann werde ich mehr Zeit für sie haben, und wir werden nicht mehr so müde sein, aber Sam wird uns fehlen. Ich erkläre ihr, dass sein Körper verbraucht ist und verbrannt werden muss, und dass wir seine Asche für immer aufbewahren werden. Ich habe für nichts mehr Kraft, nur noch für Sam. Wendy wird mit meinen Eltern verreisen. Ich sag ihr, dass Sammy sterben wird, bevor sie wiederkommt.

Ich rufe Wendy an, um ihr zu sagen, dass Sam gestorben ist. »Wie war das, Mami?« »Es sah wie eine schwere Arbeit aus, aber er hat sie gut geschafft.«”

MARTY KEYSER [18]

Sterben ist Arbeit. So beschreibt dies auch S.B. NULAND in seinem Buch “Wie wir sterben”. Er sagt: “Beim Sterben ... beherrscht die eine bedrückende Tatsache der todbringenden Krankheit alles. Wenn bei Sterbenden dennoch von Friede und manchmal auch von Freude die Rede sein kann, dann ist damit die Stunde der Erlösung gemeint. In diesem Sinn ist der Tod oft friedvoll und sogar würdevoll, für das *Sterben* gilt dies selten.” [32]. Die Aussage gilt im Wesentlichen für das Absterben des Organismus ‘von innen heraus’ und nicht für einen plötzlichen, gewaltsamen Tod von außen.

Wie ein Gesamtorganismus – insbesondere ein Mensch – eines gewaltsamen Todes (z.B. durch Unfall, Gift oder Waffe) sterben oder durch innere Prozesse (z.B. Krankheit,

Alter oder Gendefekt) zum Erliegen kommen kann, so gilt dies entsprechend auch für die Zellen – die Bausteine allen Lebens. Der durch äußere Gewalteinwirkung verursachte Tod einer Zelle wird als **Nekrose** bezeichnet. Charakteristisch dafür ist ein Zusammenbruch des Energiestoffwechsels der betroffenen Zelle mit Verlust des Membranpotentials und konsekutivem Wassereinstrom [8]. Die daraus resultierende Zellschwellung führt schließlich zur Lyse der Zelle, bei der cytoplasmatische und nukleäre Bestandteile in die Umgebung freigesetzt werden. Als Folge davon kommt es zur Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes [8, 11]. Erst in den frühen 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde eine weitere natürliche Form des Zellunterganges in multizellulären Organismen beschrieben, die den Namen ‘Apoptose’¹ erhalten hat.

1.1 Apoptose als Form des Zelltodes

Die Apoptose stellt als physiologische Form des Zellunterganges einen aktiven – also mit ‘Arbeit’ verbundenen – und damit energieabhängigen Prozess einer Zelle dar [16]. Sie läuft – vergleichbar mit dem ‘Herunterfahren’ eines Computers (statt einfach den Stecker zu ziehen) – nach einem festgelegten Programm ab und wird daher auch als *programmierter Zelltod* bezeichnet. Dieses (in der Regel von außerhalb der Zelle angestoßene) ‘Selbstmordprogramm’ führt zu charakteristischen Veränderungen der Zelle [6]: Morphologisch gesehen schrumpft die Zelle, das Chromatin kondensiert stärker und der Kern zerfällt in mehrere Fragmente. Die Zellmembran stülpt sich blasenförmig aus, und die Zelle löst sich schließlich in viele kleine, membranumhüllte Vesikel, die sog. ‘apoptotic bodies’, auf. Diese werden dann vom umliegenden Gewebe aufgenommen und *ohne* Entzündungszeichen abgebaut. Biochemisch gesehen liegen diesem Vorgang mehr oder minder spezifische Abläufe und Veränderungen innerhalb der Zelle zu Grunde [6]: Eine Aktivierung von Cystein-Proteasen, sog. Caspasen, führt unter anderem zum Abbau von Strukturproteinen, was wiederum die mikroskopisch sichtbaren Veränderungen bedingt. Eine Quervernetzung von Proteinen durch Aktivierung von Transglutaminasen führt zur Stabilitäts*erhöhung* der Zellmembran und unterstützt so die Bildung der ‘apoptotic bodies’. Charakteristisch (aber nicht spezifisch) ist der DNA-Abbau in zunächst 50-300 Kilobasen große Stücke, die dann durch aktivierte Endonukleasen in DNA-Segmente gespalten werden, die ein Vielfaches von 180-200 Basenpaaren messen. Da die Schnittstellen dabei jeweils zwischen

¹αποπτος bzw. αποπιπτειν (griechisch): unsichtbar bzw. abfallen

zwei Nukleosomen liegen, entsteht dadurch eine sog. ‘**DNA-Leiter**’. In der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran werden **Phosphatidylserine**, die sich normalerweise auf der *Innenseite* der Plasmamembran befinden, auf die Außenseite transloziert (‘umgeklappt’). Diese speziellen Phospholipide erlauben eine frühe Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen oder andere Nachbarzellen (sowie durch geeignete Färbemethoden [siehe Abschnitt 2, S. 15]) und stimulieren diese zur **Phagozytose** der untergehenden Zelle [siehe Abb. 1.1]. Dadurch wird die Freisetzung zytosolischen oder nukleären Inhaltes verhindert, und das Entstehen einer lokalen Entzündungsreaktion vermieden. In diesem Sinne stellt die Apoptose eine für den Gesamtorganismus schonende und damit physiologische Form des Zelltodes dar.

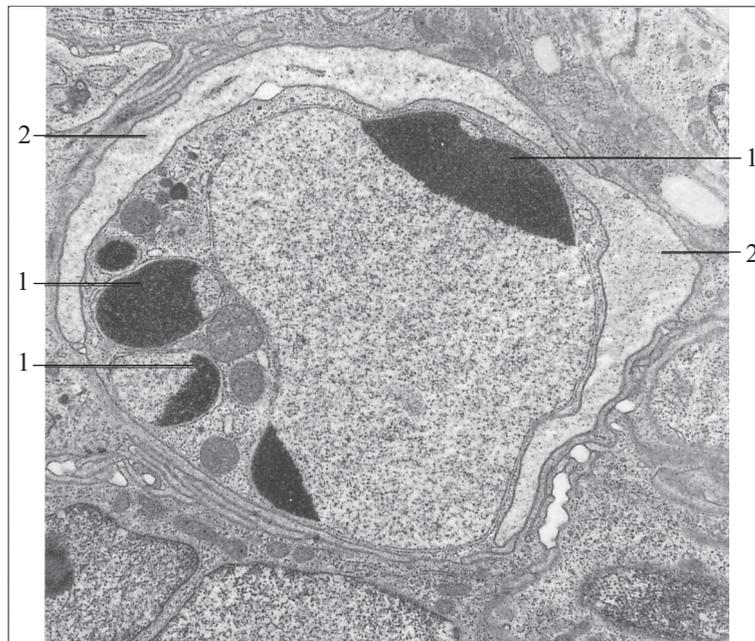


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer in Apoptose befindlichen Epithelzelle des Kaninchenendometriums [23]. 1—Kernfragmentation, 2—Phagozytose durch Makrophage.

1.1.1 Auslösemechanismen der Apoptose

Die Gründe für das Aufrufen des Apoptoseprogrammes sind vielfältig. Zum einen kann das **Fehlen** fördernder Einflüsse von außen, z.B. in Form **geeigneter Cytokine oder Wachstumsfaktoren**, zum Überwiegen pro-apoptotischer Faktoren (z.B. aus der Bcl-2-Familie²) im Bereich der Mitochondrienmembran führen. Dies löst die Freisetzung von

²Für weitere Ausführungen siehe [11].

Cytochrom c aus und stößt so die proteolytische Kaskade der Apoptose an. Beispiele für diesen Vorgang sind unter anderem beim Untergang von Neuronen in der Entwicklung des Gehirns [6] oder bei der embryonalen Entstehung der Finger aus der Handplatte [24] zu finden.

Auch *unphysiologische*, **gentoxische Einflüsse** wie Strahlung, freie Radikale oder Chemotherapeutika, die zu einer Schädigung der DNA führen, können den *physiologischen* Zelluntergang auslösen. Eine zentrale Rolle in diesem Geschehen spielt dann das Produkt des sog. Tumorsuppressorgens p53. Es führt zunächst zu einem Arrest des Zellzyklus, um eine mögliche DNA-Reparatur zu erlauben. Schlägt diese fehl, wird durch p53 die Apoptose ausgelöst³. Ein Defekt des p53-Gens und damit seiner Funktion ist oft ein entscheidender Schritt in der Cancerogenese.

Zytotoxische T-Zellen können gleichfalls die Apoptose einer Zielzelle einleiten. Dazu ist die spezifische Identifizierung einer Körperzelle als Zielobjekt notwendig. Antigene, die z.B. von Viren oder anderen intrazellulären Erregern stammen, welche die Zielzelle befallen haben, werden an der Oberfläche über MHC-I-Moleküle präsentiert und vom spezifischen T-Zell-Rezeptor der CD8-positiven T-Killerzelle erkannt. Der Hauptmechanismus besteht dann in der Freisetzung von Cytotoxinen, welche aus sog. *Perforinen* bzw. aus speziellen Proteasen bestehen. Erstere polymerisieren und bilden durch Einlagerung in die Zellmembran der Zielzelle Poren, durch die dann die als *Granzyme* bezeichneten Proteasen in die Zielzelle eindringen können. Dort aktivieren letztere schließlich direkt Caspasen und stoßen so die letzten Schritte der Apoptose an⁴. Die gezielte Eliminierung infizierter Körperzellen dämmt die Ausbreitung der Erreger ein und dient damit dem Überleben des Gesamtorganismus.

Eine spezifische **Ligand-Rezeptor-Interaktion** auf der Oberfläche einer Körperzelle (z.B. eine Epithel- oder T-Zelle) stellt einen weiteren möglichen Auslösemechanismus der Apoptose dar. Die homologe Trimerisierung von Mitgliedern aus der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptoren), die durch Bindung eines geeigneten Liganden entsteht, führt zur cytoplasmatischen Anlagerung eines Adapterproteins. Durch die sog. Todesdomäne ('death domain') eines solchen Adapterproteins wird dann die Kaskade der Caspasen ausgelöst (über autokatalytische Aktivierung nach Bindung der Procaspase 8) [6]. Wichtige Beispiele aus der TNF-Rezeptorfamilie sind dabei der

³Für weitere Einzelheiten siehe S. 290 ff in [6].

⁴Für weitere Einzelheiten siehe [13], insbesondere S. 271-276.

TNF-Rezeptor 1 (TNFR1)⁵, der Fas-Rezeptor (= CD95 = APO-1) und auch der Rezeptor CD40 [13]. **Fas** wird auf vielen Zelllinien exprimiert und führt durch die Bindung des Fas-Liganden (FasL = CD95L), welcher hauptsächlich von T-Zellen gebildet wird [13, S. 552], über den gerade beschriebenen Mechanismus zur Apoptose der Fas-tragenden Zelle. T-Killerzellen nutzen diesen Mechanismus zusätzlich zu dem beschriebenen Hauptweg über Perforine und Granzyme zur Elimination ihrer Zielzellen.

T-Lymphozyten machen während ihres Reifungsprozesses im Thymus unterschiedliche Phasen durch und müssen dabei unter anderem die sog. negative Selektion überstehen. Dabei werden autoreaktive T-Zellen eliminiert, die über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor körpereigene Strukturen erkennen. Als Mechanismus dieser Elimination wird die in diesem Fall zu starke Stimulation über den T-Zell-Rezeptor – also die Aktivierung der *unreifen* T-Zelle – angenommen. Nach neuesten Erkenntnissen sind proapoptische Faktoren der Bcl-2-Familie (z.B. Bim = ‘Bcl-2-interacting mediator of cell death’) im weiteren – im Detail noch unklaren – Ablauf des so induzierten Zelltodes involviert [4, 50]. Man spricht in diesem Zusammenhang vom ‘activation-induced cell death’ oder kurz **AICD** der T-Lymphozyten. Bei *peripheren* T-Zellen läuft der AICD über eine verstärkte Expression des Fas-Liganden und den ebenfalls zelleigenen Rezeptor Fas ab [30]. Der AICD – als Sonderform der Apoptose – dient so bei Lymphozyten der Beendigung einer Immunreaktion zur Homöostase des Immunsystems [14] oder der peripheren T-Zell-Toleranz bei fehlender Ko-Stimulation [13, S. 257].

1.1.2 Regulation und Ablauf des AICD in T-Helfer-Zellen

Zur Beschreibung des Ablaufes und der Regulation des AICD in CD4-positiven T-Helfer-Zellen liegen bisher nur bruchstückhafte Daten und Erkenntnisse vor, so dass die nun folgende Darstellung hypothetischen Charakter haben muss und als Modellvorstellung verstanden werden sollte⁶. Es liegt dabei nahe, zunächst den Ablauf der *Aktivierung* einer T-Helfer-Zelle (CD4-positiv) darzulegen (siehe Abbildung 1.2).

Zentrale Bedeutung kommt dabei dem T-Zell-Rezeptor (TCR) zu, der spezifisch die Aminosäuresequenz eines Antigenbruchstückes (AG) binden und damit erkennen kann.

⁵Unter gewissen Umständen kann über TNFR1 unter Rekrutierung anderer Adapterproteine eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgen, welcher ein *Überlebenssignal* der Zelle darstellt. Siehe dazu S. 23 f in [6].

⁶Eine detailliertere Beschreibung ist dem Anhang A.1 zu entnehmen. Im laufenden Text wird nur auf die für das weitere Verständnis notwendigen Einzelheiten eingegangen.

Dieses muss der T-Helfer-Zelle auf einem MHC-II-Molekül an der Oberfläche einer professionellen Antigen-präsentierenden Zelle (APC: dendritische Zelle, B-Zelle, Makrophage) präsentiert werden. Die T-Helfer-Zelle bindet dabei definitionsgemäß das MHC-II-Molekül unspezifisch aber zeitgleich zusätzlich über seinen CD4-Komplex im Sinne eines Korezeptors. Da der T-Zell-Rezeptor keinen wesentlichen zytosolischen Anteil besitzt, erfolgt die Weiterleitung des Stimulationssignals über den mit ihm assoziierten CD3-Komplex. Die Aktivierung der CD3-Einheit erfolgt dabei über extrazellulären Kontakt mit dem T-Zell-Rezeptor und ist somit einer (unphysiologischen) Stimulierung über Antikörper (Anti-CD3-AK = α CD3) zugänglich. Die durch Aktivierung von CD3 ausgelöste Signalkaskade gipfelt in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. NFAT⁷), die nach Translokation in den Kern zur Expression entsprechender Gene (z.B. Interleukin 2 = IL-2⁸, FasL) führen. Speziell die Produktion von IL-2, das initial zur Aktivierung der T-Zelle führt (autokrin, parakrin), wird dabei durch die Ko-Stimulation über CD28 (mittels B7 von *derselben* APC aus!) maßgeblich unterstützt. Die apoptoseauslösende Wirkung des Fas-Liganden wird dabei (zumindest anfänglich) durch den antiapoptotischen Faktor Bcl-x_L⁹ antagonisiert, dessen Expression ebenfalls durch das kostimulatorische Signal (CD28) bewirkt wird [31, 17].

Das Cytokin IL-2 kann zwar einerseits die Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 [11] induzieren [57] und damit zum Überleben der T-Zelle beitragen¹⁰. Unter anderen Umständen (z.B. *hoher* IL-2-Level [57] bzw. *repetitive* TCR-Stimulation [26]) bewirkt IL-2 aber auch das Gegenteil und fördert über FasL-Hochregulierung¹¹ die Apoptose und bewirkt so den AICD. Artifizuell kann das Apoptoseprogramm auch direkt mittels eines stimulierenden Antikörpers (Anti-Fas-AK = α Fas) gegen den Rezeptor Fas ausgelöst werden.

⁷Abkürzung für 'nuclear factor of activated T-cells', Näheres dazu im folgenden Kapitel.

⁸Bzgl. dieser und weiterer Abkürzungen im Text siehe das entsprechende Verzeichnis im Anhang C.

⁹Bcl-x_L gehört zur Bcl-2-Familie, siehe dazu [11].

¹⁰Bcl-2 bindet Calcineurin (siehe dazu 1.2.1) und verhindert so die nukleäre Translokation von NFAT und damit die Transkription des FasL-Gens [53].

¹¹z.B. mittels des Transkriptionsfaktors Stat5 ('signal transducers and activators of transcription') [57].

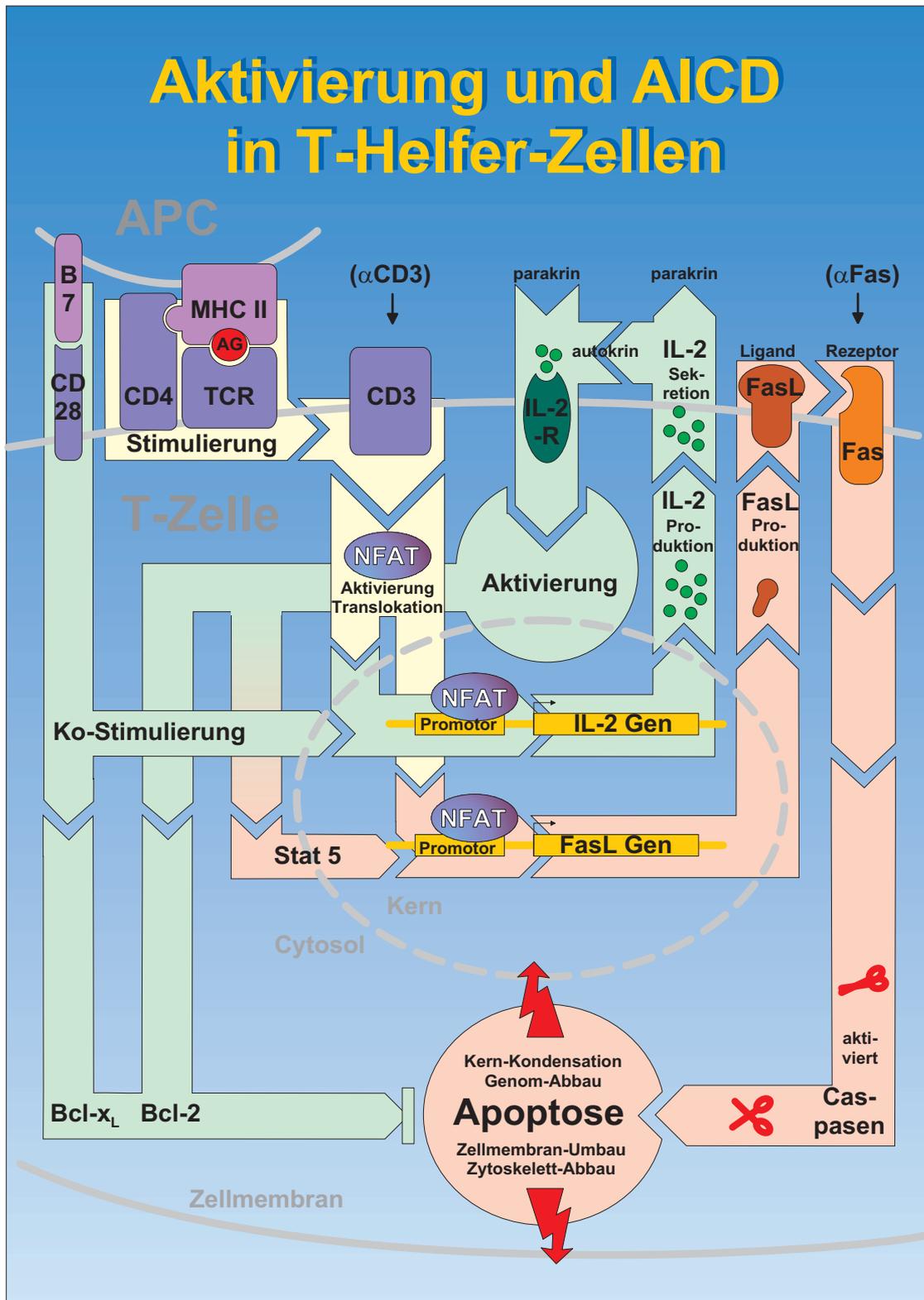


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Ablaufs von Aktivierung und Induktion des AICD in T-Helfer-Zellen. Beschreibung und Legende siehe Text (bzw. Anhang C).

1.2 Grundlegendes über NFAT-Transkriptionsfaktoren

1.2.1 Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren

NFAT-Proteine – ihr Name setzt sich aus den Anfangsbuchstaben von ‘nuclear factor of activated T cells’ zusammen – bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren, deren Erstbeschreibung 1988/89 erfolgte¹². Ihre Gemeinsamkeit besteht in einer DNA-bindenden Domäne von ca. 300 Aminosäuren Länge, die innerhalb der Familie ca 70 % Homologie besitzt und Ähnlichkeiten mit der DNA-Bindungsdomäne von Rel/NF- κ B-Faktoren aufweist, weswegen sie als ‘Rel similarity domain’ (RSD, siehe Abbildung 1.3) bezeichnet wird [47]. Da NFAT5 in vielerlei Hinsicht eine Sonderstellung einnimmt¹³, beziehen sich die nun folgenden Aussagen im Wesentlichen auf die vier ‘eentlichen’ Mitglieder NFATc1 - NFATc4 (für alternative Bezeichnungen siehe Abbildung 1.3). Diese haben am N-terminalen Ende eine starke Transaktivierungsdomäne (TAD, siehe Abbildung 1.3) gemeinsam, an die sich jeweils ein regulatorischer Bereich (Reg.) anschließt. Letzterer enthält jeweils drei sog. SP-Motive¹⁴, an denen verschiedene Proteinkinasen sowie die Proteinphosphatase Calcineurin angreift, deren Aktivität Ca^{2+} -abhängig die Translokation dieser Faktoren in den Nukleus ermöglicht. Alle NFAT-Faktoren scheinen in unterschiedlichen Isoformen (mit zusätzlichen Großbuchstaben am Ende bezeichnet) aufzutreten, die sich sowohl im N- als auch im C-Terminus unterscheiden können und so auch unterschiedliche zusätzliche Transaktivierungsdomänen (TAD) aufweisen¹⁵ (siehe Abbildung 1.3). Die Aktivität unterschiedlicher Promotoren entscheidet dabei über Splicing und Synthese der jeweiligen Formen [47].

Die Faktoren NFATc1 und NFATc2 werden hauptsächlich in peripheren Lymphozyten, speziell in T-Zellen, exprimiert, wo sie eine wichtige funktionelle Rolle spielen [47, 37, 38, 5]. NFATc3 wird dagegen hauptsächlich in Thymozyten exprimiert, während NFATc4 in nicht-lymphoiden Zellen exprimiert wird [43, 39].

Es wurden unterschiedliche Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren¹⁶ nachgewiesen, darunter viele Cytokine (IL-2 bis IL-5, Interferon γ , TNF α , Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) [47], Oberflächenmoleküle (FasL, CD40) [47, 25] sowie

¹²Als mögliche Transkriptionsfaktoren aus aktivierten Jurkat-T-Zellen, die den IL-2-Promotor binden können [51, 46].

¹³Z.B. besitzt die RSD von NFAT5 nur 40 % Homologie mit den anderen NFAT-Familienmitgliedern.

¹⁴Serin/Prolin-Phosphorylierungsbereiche

¹⁵Näheres dazu siehe z.B. [47, 5].

¹⁶oft in Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor AP-1

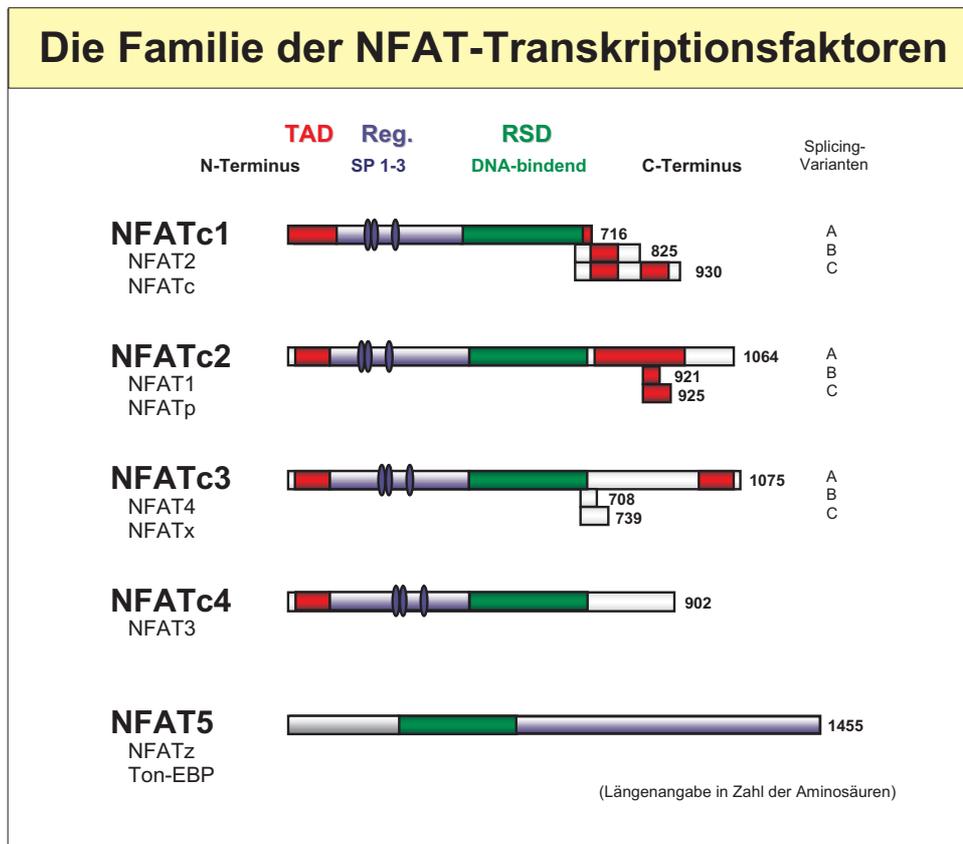


Abbildung 1.3: Überblick zu Struktur und Bezeichnungen der NFAT-Transkriptionsfaktoren. TAD = Transaktivierungsdomäne, Reg. = regulatorischer Bereich mit SP-Motiven (Serin/Prolin-Phosphorylierungsbereiche), RSD = ‘Rel similarity domain’ [48].

intrazelluläre Signalüberträger (p56^{lck}, Egr2, Egr3, NFATc1) [47]. Dabei kommt dem Faktor NFATc1 mehr die Rolle eines *positiven*, verstärkenden Regulators der Immunantwort zu, wohingegen NFATc2 und NFATc3 offenbar eher eine *negative*, dämpfende Wirkung auf das Immunsystem besitzen [37]. Diese Einschätzung gründet sich größtenteils auf die Ergebnisse von sog. Knock-out-Experimenten, bei denen ein oder mehrere Gene in der Regel in allen Körperzellen eines Lebewesens ausgeschaltet werden.

1.2.2 Der Phänotyp NFAT-defizienter-Mäuse

Zur Analyse des Immunsystems hat sich die Maus als Tiermodell durchgesetzt. Daher wird in der folgenden Tabelle 1.1 der Phänotyp von entsprechenden ‘Knock-out-Mäusen’ beschrieben, bei denen durch Inaktivierung in der Keimbahn sowie durch geeignete Kreuzungen *beide Allele* eines Gens ausgeschaltet wurden¹⁷.

¹⁷Markiert wird das Fehlen *eines* aktiven Allels mit hochgestelltem -/+ (=heterozygot) bzw. *beider* aktiver Allele mit -/-, während +/+ das Vorliegen beider Allele (= i.d.R. ‘Wildtyp’) des Gens bedeutet.

Genotyp NFAT				Phänotyp Maus							
c1 -/-	c2 -/-	c3 -/-	c4 -/-	IL 2	INF γ	IL 4	Lymphozyten	Apoptose	Sonstiges	Quelle	
●	○	○	○	—	—	—	—	—	intrauteriner Fruchttod vor 14. Gestationstag wegen Herzfehler	[47, 34]	
Lymphozyten (chimäre Tiere)				≈ (↑)		↓	Proliferation ↓		Thymus hypotroph	[36, 47]	
○	●	○	○				Hyperproliferation (T+B), Prä/Hyperaktivierung, gesteigerte Immunantwort	Fas-vermittelte Apoptose idem, FasL ≈	Splenomegalie (>3 Monate), Thymusinvolution verspätet, Keimzentren vergrößert	[44]	
				≈	≈	früh ↓ spät ↑		FasL ↓ (mRNA)		[12]	
○	○	●	○	≈	≈	≈	Ausreifung ↓, Hyperaktivierung	bei CD4/CD8-doppelt positiven Thymozyten <i>vermehrt</i> , evtl. AICD von peripheren T-Zellen <i>erhöht</i>		[33]	
○	○	○	●	=	=	=	=	=	unauffälliger Phänotyp	[9]	
●	●	○	○	↓	↓	↓	Proliferation idem, Prä-/Hyperaktivierung, Effektorfunktion der T-Zellen reduziert	FasL ↓	periphere Lymphorgane leicht vergrößert	[34]	
○	●	●	○	↓	↓	↑↑	Hyperproliferation, Prä-/Hyperaktivierung, CD4/CD8-Verhältnis sinkt in Lymphknoten	FasL ↓ (mRNA), Fas-vermittelte Apoptose ↓	Splenomegalie, entzündliche Organinfiltrationen	[37]	
○	○	●	●	—	—	—	—	—	intrauteriner Fruchttod ca. 11. Gestationstag wegen defekter Angiogenese	[9, 3]	
●	○	○	●	?	?	?	?	?	?	?	
○	●	●	●	—	—	—	—	—	intrauteriner Fruchttod mit Defekt der neuronalen Entwicklung	[10]	

Tabelle 1.1: Übersicht über den Phänotyp unterschiedlicher NFAT-knock-out-Mäuse. ‘●’ = -/- = knock-out, ‘○’ = +/+ = Wildtyp des entsprechenden Gens. ‘↑’ bzw. ‘↓’ bedeuten Zu- bzw. Abnahme, ‘=’ bzw. ‘≈’ bedeuten gleich bzw. ungefähr gleich. ‘?’ bzw. ‘—’ bedeuten bisher bzw. prinzipiell unbekannt. Interferon γ (INF γ) bzw. Interleukin 4 (IL-4) ist jeweils charakteristisch für eine T-Helferzell-Antwort vom Typ 1 (Inflammation) bzw. Typ 2 (Helferzellantwort im engeren Sinne).

Als ‘Doppel’- bzw. ‘Tripel’-defiziente-Mäuse bezeichnet man Tiere, bei denen gleichzeitig zwei bzw. drei Gene (jeweils beide Allele) inaktiviert wurden.

Der Aufstellung (Tabelle 1.1) ist unter anderem zu entnehmen, dass NFATc2 und NFATc3 *in vivo* zumindest teilweise überlappende Funktionen besitzen, die speziell für die *Inaktivierung* von Lymphozyten unabdingbar sind. Die Aufgaben von NFATc1 hingegen liegen in der *Aktivierung* der Immunantwort und können *nicht* von anderen Mitgliedern der NFAT-Familie übernommen werden. Da die Auswirkungen der NFAT-Defizienz auf die Apoptose (speziell von NFATc2 [44, 12]) in der Literatur widersprüchlich beschrieben werden, soll darauf im nächsten Abschnitt ausführlicher eingegangen werden.

1.2.3 NFAT-Faktoren und AICD

Bereits 1989 wurde erkannt, dass durch die exogene Substanz Cyclosporin A (CsA) der AICD in T-Zellen verhindert werden kann [52]. Aus der bekannten Tatsache, dass CsA die Phosphatase Calcineurin blockiert [47], ergab sich die Vermutung, dass NFAT-Faktoren, deren Translokation in den Nukleus durch CsA verhindert wird, neben der Aktivierung auch den AICD der T-Zellen kontrollieren. Nachdem die Fas-vermittelte Apoptose als möglicher Mechanismus des AICD diskutiert wurde [19], konnten dann LATINIS ET AL. tatsächlich zwei NFAT-Bindungsstellen im FasL-Promotor nachweisen [25]. Die weiteren Bemühungen zielten dann darauf ab, die Beteiligung und Wirkung der unterschiedlichen NFAT-Familienmitglieder dabei zu beleuchten. Der Übersichtlichkeit wegen wurden einige wesentliche Ergebnisse dieser Experimente in tabellarischer Form dargestellt (siehe Tabelle 1.2).

In der Zusammenschau dieser Resultate scheint der Zusammenhang von NFATs, Fas-Ligand und AICD eindeutig belegt. Allerdings wurde der direkte Nachweis der *Apoptose* von HODGE ET AL. [12] und PENG ET AL. [34] gar nicht geführt, und bei SCHUH ET AL. [44] wurde die Apoptose allem Anschein nach auf ungeeignete, d.h. nicht aussagekräftige Weise ausgelöst (was zumindest einen Teil der scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse erklären könnte). Bei RANGER ET AL. [37] war eine vierfache Stimulation zur Auslösung nötig (oder doch zumindest verwendet), wobei bereits eine einmalige Restimulation der Datenlage nach zur Auslösung des AICD genügen sollte [7]. OUKKA ET AL. [33] konnten in *Thymozyten* eine *vermehrte* Apoptose zeigen, was im Widerspruch mit dem erwarteten Verhalten in *peripheren* T-Zellen steht. MACIAN ET AL. [27] verwendeten

Jahr Quelle	Zelltyp (murin)	Stimulation des AICD	Ergebnis	Methode
1996 [12]	NFATc2 ^{-/-} Splenozyten	in vivo Injektion von α CD3	FasL-mRNA \downarrow (nach 1 h)	Northernblot
1998 [44] ¹⁸	NFATc2 ^{-/-} T-Zellen aus Lymphknoten	Stimulation 5 d mit Superantigen (Staphylokokken) dann α Fas	FasL-Protein \approx (nach 5-24 h) Apoptose \approx	Westernblot Zahl lebender Zellen
1998 [33]	NFATc3 ^{-/-} Thymozyten Splenozyten	erst α TCR dann α CD3	Apoptose \uparrow (nach 20 h) FasL-mRNA \uparrow	TUNEL-Assay Northernblot
1998 [37]	NFATc2 ^{-/-} -c3 ^{-/-} Lymphknoten- zellen (T-Zellen)	1x α CD3 (6 h) 4x α CD3 (20 h)	FasL-mRNA $\downarrow\downarrow$ Apoptose $\downarrow\downarrow$	Northernblot TUNEL-Assay
2000 [27]	NFATc2 ^{+/+} retrovirale Über- expression in T-Zell-Klonen	α CD3 (für 48 h)	Apoptose \uparrow (Kooperation mit AP-1 für FasL- Promotor nötig)	Propidium-Iodid- Färbung
2001 [34]	NFATc1 ^{-/-} -c2 ^{-/-} CD4 ⁺ -T-Zellen aus Milz	sekundäre Stimulation mit α CD3 + α CD28	FasL-Expression \downarrow (nach 6 h)	FACS-Analyse

Tabelle 1.2: Übersicht über Experimente bezüglich des Zusammenhangs zwischen NFAT-Faktoren und AICD. ‘ \uparrow ’ bzw. ‘ \downarrow ’ bedeuten Zu- bzw. Abnahme, ‘h’ bzw. ‘d’ bedeuten Stunde(n) bzw. Tag(e). ‘ \approx ’ bedeutet ‘ungefähr gleich’ (zu Wildtyp), ‘1x’ bzw. ‘4x’ bedeutet ‘einmalige’ bzw. ‘viermalige’ (also damit quartäre) Stimulation. Bei Angabe mehrerer Zelltypen bezieht sich die erste Zellart auf das obere und die zweite Zellart auf das untere Experiment.

einen regelmäßig restimulierten T-Zell-Klon (D5), was die Aussagekraft über periphere T-Zellen zumindest abschwächt. Alles in allem ist der genaue Zusammenhang zwischen NFAT-Faktoren – insbesondere von NFATc2 wegen der widersprüchlichen Aussagen in [44] und [12] (siehe Tabelle 1.2) – und dem AICD noch nicht befriedigend geklärt.

1.3 Problemstellung dieser Arbeit

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand nun darin, die Rolle der NFAT-Faktoren im AICD von peripheren T-Zellen näher zu charakterisieren. Naturgemäß liegt dabei das Hauptaugenmerk auf dem Faktor NFATc2, dem, wie bereits erwähnt, ein dämpfender Einfluss auf die Immunantwort und damit eine pro-apoptotische Wirkung zugesprochen wird. Obwohl in peripheren T-Zellen NFATc2 (zusammen mit dem immunaktivierenden NFATc1) quantitativ gegenüber dem Faktor NFATc3 überwiegt, soll letzterer dennoch in die Untersuchung mit einbezogen werden, da auch NFATc3 als immundämpfend ein-

¹⁸Analoge Experimente mit IL-2^{-/-}-Tieren (statt NFATc2^{-/-}) zeigten eine *verminderte* Apoptose im Vergleich zum Wildtyp.

gestuft wird und daher eine überlappende oder gar stellvertretende Funktion aufweisen könnte.

Das Prinzip zur Untersuchung des NFAT-Einflusses soll dabei darin bestehen, Apoptose in peripheren T-Zellen aus **NFAT-defizienten Knock-out-Mäusen** auf geeignete Weise auszulösen und mit dem Verhalten von T-Zellen aus unveränderten Kontrollmäusen ('Wildtyp') zu vergleichen. Zur Erzielung einer weitgehend homogenen Verhaltensweise beschränkt sich die Untersuchung dabei auf die Verwendung von T-Helfer-Zellen (CD4-positiv), die aus Lymphknoten der entsprechenden Mäuse gewonnen wurden.

Zunächst soll nun im folgenden Kapitel das Design der durchgeführten Experimente genauer dargelegt werden, bevor im weiteren Verlauf die Ergebnisse präsentiert werden. In der abschließenden Diskussion wird dann neben einer Besprechung kritischer Details auch eine Wertung der Resultate mit Berücksichtigung ihrer Konsequenzen dargelegt, sowie auf weiterführende Aspekte im Gesamtbild des AICD eingegangen.

Kapitel 2

Design des Experiments

Ausgangspunkt der durchgeführten Experimente war das Vorliegen **heterozygoter Mäuse**, denen jeweils ein Allel des Gens für NFATc2 und NFATc3 fehlt. Entstanden waren diese Tiere aus der Kreuzung NFATc2-defizienter [12] und NFATc3-defizienter [33] Mäuse mit ursprünglichem Balb/c-Hintergrund. In unserem Labor wurden nun die doppelt-heterozygoten Tiere, die wir von der Arbeitsgruppe um L.H. GLIMCHER erhielten, solange untereinander **gekreuzt**, bis schließlich die unterschiedlichen **homozygoten** Einfach- oder Doppelt-knock-out-Mäuse entstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei NFATc2^{-/-}c3^{+/-}, NFATc2^{-/-}c3^{-/+} und NFATc2^{-/-}c3^{-/-}-Mäuse (siehe Abbildung 2.1) neben entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (NFATc2^{+/+}c3^{+/+}-Balb/c) verwendet.

Unter sterilen Bedingungen wurden den im Alter von ca. 6 Wochen getöteten Versuchstieren die **Lymphknoten** (in der Regel cervical, axillär, inguinal, paraaortal und mesenterial) zur Weiterverarbeitung entnommen. Nach mechanischer Homogenisierung der Lymphknoten folgte über geeignete Säulen-Chromatographie¹ eine **Aufreinigung** der Zellsuspension zur Gewinnung **CD4-positiver T-Zellen**². Diese wurden nun auf eine einheitliche Zelldichte eingestellt und auf Gewebekulturplatten ausgebracht. Über die Dauer von drei Tagen erfolgte dort unter Brutschrankbedingungen die **Stimulation** der T-Helfer-Zellen. Die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung wurde mit plattengebundenen³ Anti-CD3-Antikörpern (α CD3) simuliert (siehe Abschnitt 1.1.2 und Abbildung 1.2). Lösliche Anti-CD28-Antikörper (α CD28) sorgten für das kostimulatorische Signal. Zur Förderung

¹Für Details der Vorgehensweise siehe Anhang B.

²Laut Datenblatt mit einer Effizienz von 95 % CD4⁺-Zellen bei < 1 % CD8⁺-Zellen und < 1 % B-Zellen im Eluat.

³Auf den Kulturplatten wurden Antikörper gegen armenische-Hamster-IgG adsorbiert, die dann die α CD3-Antikörper (aus armenischem Hamster) fixierten.

KAPITEL 2. DESIGN DES EXPERIMENTS

des Zellwachstums wurde zusätzlich noch Interleukin 2 (IL-2) zugesetzt.

Nach dieser initialen Stimulation über drei Tage wurden die Zellen gewaschen und für vier weitere Tage unter Zugabe von IL-2 **amplifiziert**. Während dieser proliferativen Expansionsphase musste das IL-2-haltige Medium mehrfach erneuert werden.

Nach der insgesamt sieben Tage dauernden Vorbereitungsphase wurde dann nach Entfernung des IL-2 durch erneutes Waschen der Zellen die **Induktion der Apoptose** eingeleitet. Dazu wurden die Zellen alternativ entweder einer erneuten, diesmal aber wegen des *fehlenden* kostimulatorischen Signals *inkompletten* Aktivierung durch plattengebundene α CD3-Antikörper ausgesetzt, oder es wurden lösliche Anti-Fas-Antikörper (α Fas) zugegeben. Nach unterschiedlichen Zeitabschnitten (6-48 Stunden) wurden dann einzelne Proben⁴ zur Messung des Anteils apoptotischer Zellen entnommen. Die T-Zellen wurden mit Hilfe des Fluorescein-gekoppelten Farbstoffes **Annexin-V** gefärbt, der spezifisch an Phosphatidylserin bindet, welches bei apoptotischen Zellen von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran transloziert wird (siehe Abschnitt 1.1). Zum Ausschluss nekrotischer Zellen wurde teilweise mit einem zweiten, ebenfalls fluoreszierenden Farbstoff (7-Amino-Actinomycin D = 7-AAD) gegengefärbt, der in nekrotische Zellen mit desintegrierter Zellmembran eindringen kann und so nur diese markiert. Die so behandelten Zellen wurden dann mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (FACS) analysiert. Das Gerät misst dabei die Zellgröße, die Granularität und die Fluoreszenz dreier unterschiedlicher Frequenzbereiche (FL1-FL3) mittels **Durchflusszytometrie**. Dabei werden sequentiell jede einzelne Zelle und damit die ggf. gekoppelten Farbstoffe mit Laserlicht angeregt. Über einen geeigneten Photodetektor wird neben dem Streulicht in Vorwärtsrichtung ('forward scatter', FSC), das eine Aussage über die *Größe* der Zelle erlaubt,⁵ und dem Streulicht in Seitwärtsrichtung ('side scatter' = SSC), das eine Aussage über die *Granularität* der Zelle ermöglicht,⁶ mittels dreier Filtersysteme auch die Emission der angeregten Farbstoffe registriert, und die Amplitude dreier Wellenlängenbereiche gemessen ('FL1-Height' = FL1-H bis FL3-H) [58, 13]. Dabei wird die Fluoreszenz des Annexin-V-gebundenen Farbstoffes im Bereich FL2 und die des 7-AAD im Bereich FL3 registriert.⁷ Dies ermöglicht die exakte quantitative Erfassung und Klassifizierung der spezifisch gefärbten Zellen und gewährleistet, aufgrund der Auswahl obiger Farbstoffe,

⁴Jeweils aus eigenen Kammern der Gewebekulturplatten.

⁵Hohe Amplitude, d.h. hohe 'FSC-Height' = FSC-H bedeutet große Zelle und umgekehrt.

⁶Hohe Amplitude, d.h. hohe 'SSC-Height' = SSC-H bedeutet hohe Granularität und umgekehrt.

⁷FL1 wurde in dieser Arbeit nicht genutzt.

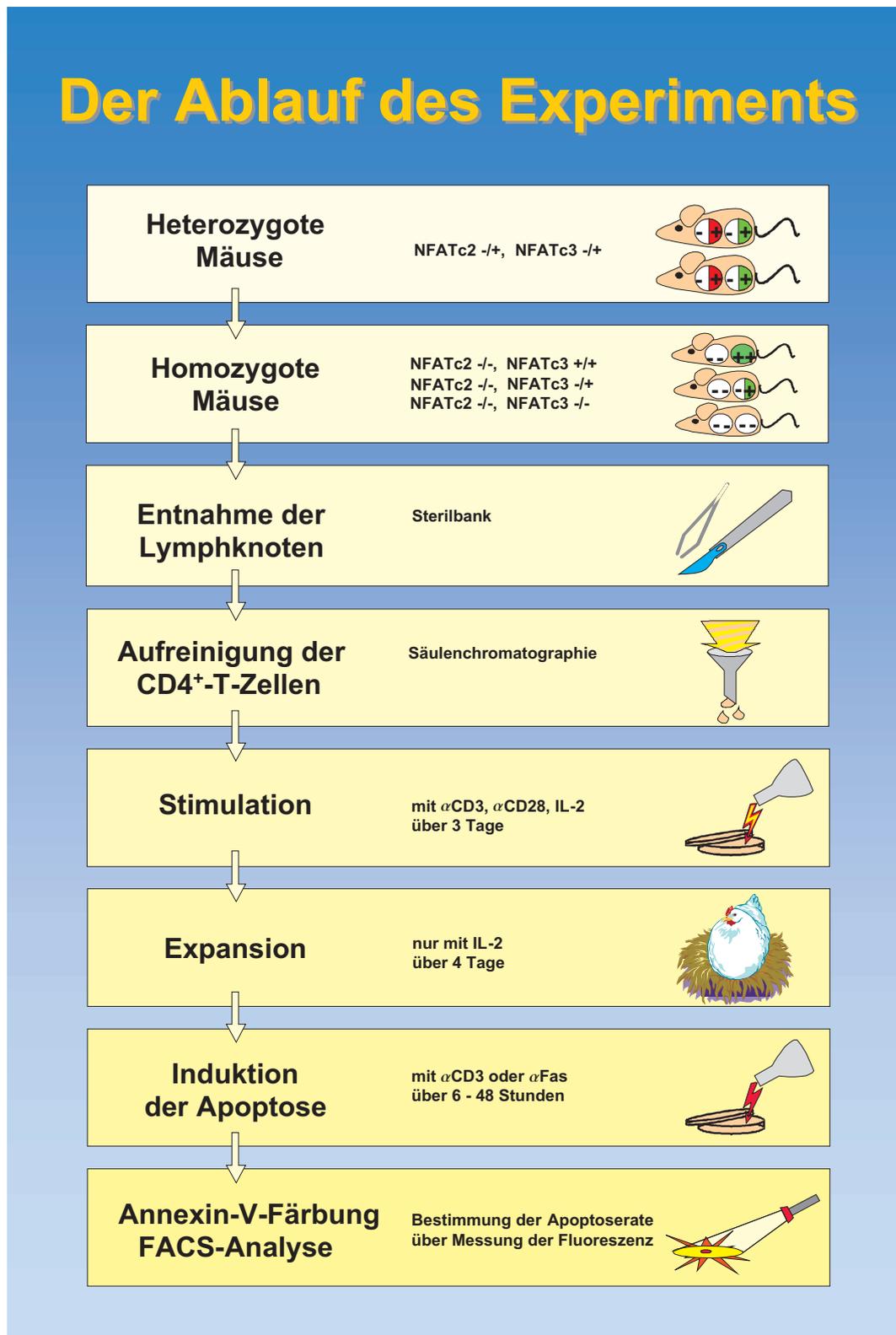


Abbildung 2.1: Überblick über Design und Ablauf des Experiments. Beschreibung im Text.

KAPITEL 2. DESIGN DES EXPERIMENTS

die Ermittlung des Anteils apoptotischer Zellen in der jeweiligen Zellpopulation.

Als Kontrolle dienten einerseits jeweils analoge Wildtyp-Mäuse (ohne NFAT-Defizienz) und für jeden Messzeitpunkt zusätzlich entsprechende Zellen (Knock-out und Wildtyp) mit derselben Vorbehandlung, allerdings *ohne* die finale Apoptose-Induktion⁸.

⁸Jeweils ohne Zugabe von Antikörpern (ohne sekundäre Stimulation) bzw. Zugabe nur der plattengebundenen Antikörper gegen armenische-Hamster-IgG (α Ham) ohne daran gebundenes α CD3 oder α Fas.

Kapitel 3

Ergebnisse

Jede 'Einzelmessung' bestand aus der Analyse von 20.000 Zellen und kann durch folgende Merkmale charakterisiert werden:

1) Zellart bzw. Grad des NFAT-Knock-outs (K.o.-Grad):

- a) NFATc2^{+/+}c3^{+/+} kurz c2^{+/+}c3^{+/+} = K.o.-Grad 0 (Wildtyp)
- b) NFATc2^{-/-}c3^{+/+} kurz c2^{-/-}c3^{+/+} = K.o.-Grad 1 (Einfach-k.o.)
- c) NFATc2^{-/-}c3^{-/+} kurz c2^{-/-}c3^{-/+} = K.o.-Grad 1^{1/2} (1^{1/2} fach-k.o.)
- d) NFATc2^{-/-}c3^{-/-} kurz c2^{-/-}c3^{-/-} = K.o.-Grad 2 (Doppelt-k.o.)

2) Art der Apoptoseinduktion (Induktion):

- a) keine = spontan ¹
- b) mittels Anti-CD3-Antikörpern = α CD3
- c) mittels Anti-Fas-Antikörpern = α Fas

3) Meßzeitpunkt nach Beginn der Induktion (Zeit):

- a) 6 Stunden = 6 h
- b) 12 Stunden = 12 h
- c) 24 Stunden = 24 h
- d) 48 Stunden = 48 h

Gemessen wurde für jede Zelle das Ausmaß des Streulichts in Vorwärts- (FSC-H) und Seitwärtsrichtung (SSC-H), sowie das Ausmaß der Fluoreszenz im Bereich 2 (FL2-H), das auf Grund des verwendeten Farbstoffes Annexin-V eine Aussage darüber erlaubt, ob sich die Zelle in Apoptose befindet (bindet ausreichend Annexin) oder nicht. Dieser letzte

¹Hierunter fällt auch die ledigliche Zugabe von Anti-Hamster-IgG-Antikörper (α Ham).

Parameter (FL2-H) stellt also den ausschlaggebenden Messwert dar. Die zum Teil erfolgte zusätzliche Färbung mit 7-AAD und entsprechende Auswertung von FL3-H diente lediglich zum Ausschluss des Vorliegens von Nekrose (statt Apoptose) und wird nun in der weiteren Darlegung der Ergebnisse nicht gesondert berücksichtigt werden.

3.1 Auswertungskriterien

Die unterschiedlichen graphischen Darstellungsweisen und das weitere Vorgehen der Auswertung sollen in Abbildung 3.1 exemplarisch gezeigt werden.

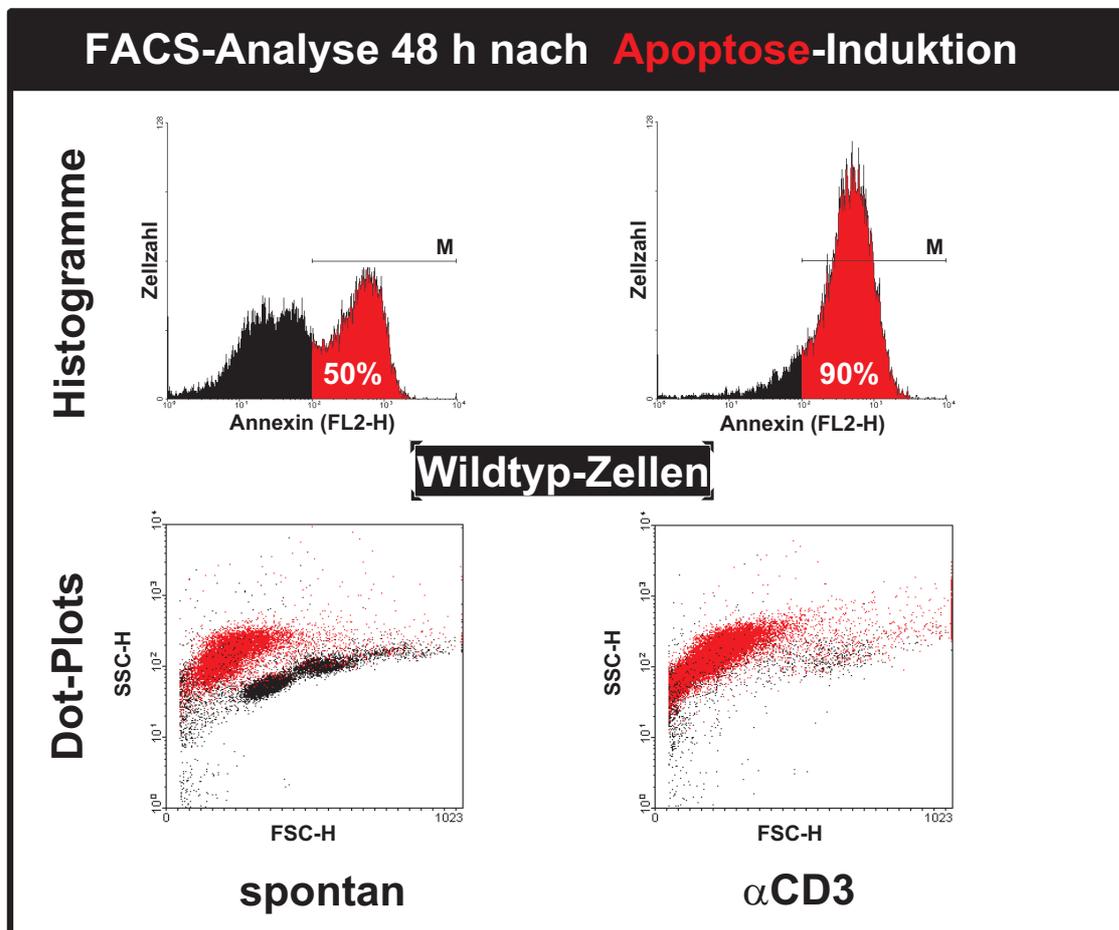


Abbildung 3.1: Darstellung der Messwerte einer FACS-Analyse 48 h nach Apoptose-Induktion mit Anti-CD3-Antikörpern (α CD3) bei Wildtyp-Zellen, im Vergleich zu Zellen gleichen Alters *ohne* zusätzliche Apoptose-Induktion (spontan). Die mit 'M' bezeichnete horizontale Linie stellt in seiner horizontalen Ausdehnung den sog. 'Marker' dar. Die in diesen Messbereich fallenden Werte (FL2-H zwischen 10^2 und 10^4) sind rot dargestellt und die zugehörigen Zellen werden als apoptotisch registriert (Anteil in % zur Gesamtzahl als weißer Wert dargestellt).

In sog. 'Dot-Plots' wird jede gemessene Zelle durch einen eignen Punkt dargestellt (hier

20.000 pro Diagramm), die Koordinaten dieses Punktes sind dabei durch die Messwerte bestimmt (hier FSC-H als Abszisse und SSC-H als Ordinate, siehe untere Hälfte der Abbildung 3.1). Es werden also in einem Diagramm gleichzeitig *zwei* Messparameter dargestellt. In einem sog. **Histogramm** dagegen wird nur *ein* Parameter (hier FL2-H nach Färbung mit Annexin-V) als Abszisse ausgewertet, und die zugehörige Anzahl der Zellen mit dem jeweiligen Messwert als Häufigkeit (Ordinate) aufgetragen. Dies erlaubt die leichtere optische Erfassung der quantitativen Verhältnisse (siehe obere Hälfte der Abbildung 3.1).

Apoptotische Zellen werden durch Annexin-V gefärbt und zeigen demnach eine hohe Fluoreszenz im Bereich 2 (FL2-H groß). Bezüglich dieses Parameters zerfällt die gemessene Zellpopulation in zwei Klassen (keine Apoptose \leftrightarrow Apoptose), was sich an der zweigipfligen Verteilung im linken Histogramm der Abbildung 3.1 (oben) gut erkennen lässt. Nicht für jede gemessene Zelle ist die Zuordnung jedoch eindeutig möglich – dies spiegelt sich im Überlappungsbereich der beiden ‘Peaks’ wieder – so dass die definitive, in dieser Arbeit durchgehend verwendete Trennungslinie bei $\text{FL2-H} = 10^2$ (im Tal zwischen den beiden Gipfeln) intuitiv und letztlich willkürlich ist. Der Marker ‘M’ (horizontale Linie in den beiden Histogrammen der Abb. 3.1) kennzeichnet also den Bereich, in dem die apoptotischen Zellen liegen. Deren relativer Anteil an der insgesamt gemessenen Zellzahl (jeweils 20.000 Stück) ist in Prozent (weiße Schrift) angegeben. Die Messpunkte aller in diesen Bereich fallenden Zellen sind hier zur besseren Übersicht rot eingefärbt (sowohl in den Histogrammen als auch in den ‘Dot-Plots’). Durch diese Farbgebung können in den ‘Dot-Plots’ die apoptotischen Zellen identifiziert werden. Auch hier stellen sie eine getrennte Population dar und sind im Vergleich zu den lebenden Zellen (schwarze ‘Wolke’ im linken Diagramm, Abb. 3.1) kleiner (im Mittel FSC-H niedriger) und stärker granuliert (SSC-H höher), was mit der Bildung von ‘apoptotic bodies’ (s. Abschnitt 1.1) übereinstimmt.

In Abbildung 3.1 sind Wildtyp-Zellen 48 Stunden nach Apoptoseinduktion mittels Anti-CD3-Antikörper (rechte Spalte) im Vergleich mit gleichalten Zellen *ohne* definierte Apoptoseinduktion (linke Spalte) dargestellt. Die Anwendung der αCD3 -Antikörper hat somit bei diesen Zellen eine Steigerung der Apoptoserate von 50 % (spontan) auf 90 % (αCD3) bewirkt. Nach diesem Muster erfolgt nun die Auswertung der durchgeführten Messungen in Abhängigkeit von den oben aufgeführten Parametern, d.h. der jeweiligen

Zellart (K.o.-Grad 0, 1, 1 $\frac{1}{2}$, 2), der entsprechenden Induktionsart (spontan, α Fas, α CD3) und dem Messzeitpunkt (6, 12, 24, 48 h).

3.2 NFAT-Defizienz hemmt die CD3-vermittelte Apoptose

In einem direkten Vergleich der gewonnenen Daten für T-Helfer-Zellen aus den Lymphknoten von Wildtyp-Mäusen mit denen aus NFATc2-knock-out-Mäusen lässt sich bereits auf den ersten Blick eine Reduktion der durch α CD3-Antikörper ausgelösten Apoptose bei den NFAT-defizienten Zellen erkennen (siehe Abbildung 3.2). Dabei sind in jedem einzelnen Histogramm² alle vier Messzeitpunkte (6, 12, 24 bzw. 48 h nach Apoptoseinduktion) farblich kodiert übereinander aufgetragen und lassen so die Dynamik unmittelbar erkennen. Bei beiden Zelltypen (Wildtyp; NFATc2^{-/-}³) wird *spontan* erst nach ca. 48 Stunden Apoptose induziert (linke Spalte, insbesondere blaue Kurven, Abb. 3.2). Nach Stimulation mit α CD3-Antikörpern hingegen (rechte Spalte, Abb. 3.2) zeigt sich bei den Wildtyp-Zellen bereits nach 12 Stunden eine ausgeprägte Apoptose (gelb-orangene Kurve, Abb. 3.2). Bei den Knock-out-Mäusen dagegen tritt erkennbare Apoptose erst 24 Stunden nach Induktion auf (rote Kurve, Abb. 3.2), und das in deutlich geringerem Ausmaß.

Im Gegensatz dazu lässt sich auch bei den NFATc2-defizienten Zellen Apoptose durch Verwendung von α Fas-Antikörpern im *selben* Umfang wie bei den Wildtyp-Zellen auslösen (mittlere Spalte, Abb. 3.2).

3.2.1 Quantitative Betrachtungen

Wie bereits in Abschnitt 3.1 dargelegt, erfolgt die quantitative Auswertung der gerade dargestellten Ergebnisse über die Bestimmung der **Apoptoserate** aus den jeweiligen Histogrammen (Anteil der Zellen mit im ‘Apoptose-Bereich’ liegenden Werten von FL2-H). Diese kann dann in Abhängigkeit der Parameter graphisch – z.B. in Form von Balkendiagrammen – aufgetragen werden. Die Wertepaare – bestehend aus je vier Komponenten (Apoptoserate, Zelltyp = K.o.-Grad, Induktionsart, Messzeitpunkt) – können auf Grund der Dreidimensionalität des Raumes (bzw. der Zweidimensionalität der Papieroberfläche)

²Beschriftung der Abszisse statt mit ‘FL2-H’ mit dem aussagekräftigeren ‘Annexin-V’, das diese Fluoreszenz ja hervorruft.

³= NFATc2^{-/-}c3^{+/+}, wenn nicht explizit anders vermerkt.

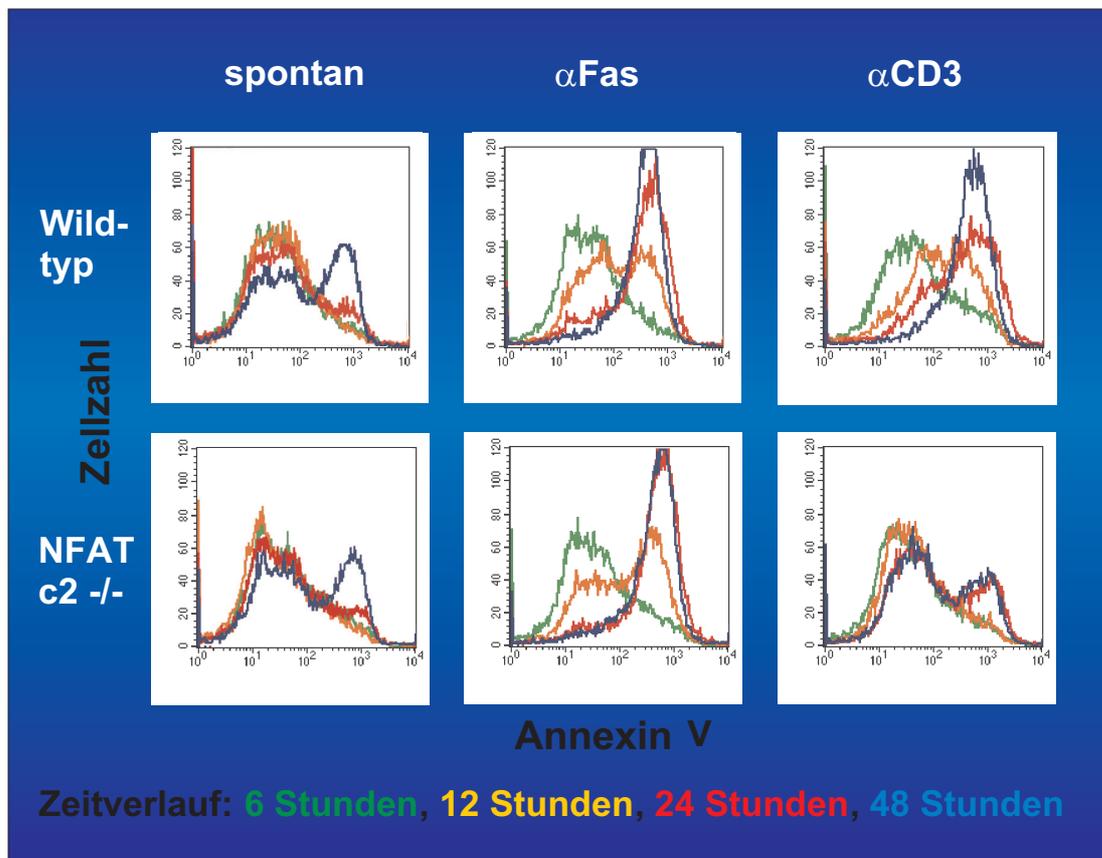


Abbildung 3.2: Die Histogramme zeigen die Annexin-V-Bindung (über Messung von FL2-H) in der FACS-Analyse von T-Helfer-Zellen aus Lymphknoten von NFATc2-knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten (farbig kodiert) nach Induktion der Apoptose durch α CD3 bzw. α Fas im Vergleich zum spontanen Verlauf. Aufgetragen ist dabei jeweils die Häufigkeit (insgesamt je 20.000 Zellen) über der zugehörigen Ausprägung der Annexin-V-Bindung zur Identifizierung apoptotischer Zellen.

jedoch nicht in *einem* Diagramm übersichtlich zusammengefasst werden. Je nach Blickwinkel ergeben sich statt dessen unterschiedliche *Gruppen* von Diagrammen. Zusätzlich wird die Situation noch dadurch komplexer, dass die Daten aus *zwei unterschiedlichen* Experimenten stammen, bei denen Tiere mit teilweise unterschiedlichem ‘Knock-out-Grad’ verwendet wurden.

Experiment A: Wildtyp⁵; NFATc2^{-/-}c3^{+/+}; NFATc2^{-/-}c3^{-/-}

Experiment B: Wildtyp; NFATc2^{-/-}c3^{+/+}; NFATc2^{-/-}c3^{-/+};

Daten zur Wirkung von α Fas-Antikörpern stehen nur aus Experiment A zur Verfügung. Stellt man folglich die Ergebnisse für die jeweiligen Zellarten (getrennt in Experiment A

⁵zwei verschiedene Wildtyp-Tiere parallel

und B) gesondert dar, ergeben sich die sechs Diagramme (a-f) in Abbildung 3.3.⁶

In dieser Konstellation lässt sich die Wirkung der CD3-Stimulation zur Auslösung der Apoptose bei den verschiedenen Zellarten gut erkennen. Bei Wildtyp-Zellen zeigt sich nach Induktion mit α CD3 im Vergleich zum spontanen Verlauf praktisch zu allen Zeitpunkten eine deutliche Steigerung der Apoptoserate (Abb. 3.3 orange versus grün in a und d), während im Gegensatz dazu ein Unterschied zur Wirkung von α Fas nicht zu erkennen ist (Abb. 3.3 rot versus orange in a). Bei den Zellen mit fehlendem NFATc2 ist im Experiment B im Vergleich zum Wildtyp eine eindeutige Reduktion der durch α CD3 induzierten Apoptose zu erkennen (Abb. 3.3 orange in d bzw. e), die aber weiterhin *deutlich* über der spontanen Rate liegt (Abb. 3.3 orange versus grün in e). Bei Experiment A dagegen ist im selben Zelltyp (Abb. 3.3 b) *keine* sichere Apoptoseinduktion durch α CD3 mehr zur erkennen (orange versus grün), wohingegen die Wirkung von α Fas unbeeinträchtigt ist (Abb. 3.3 rot in a und b jeweils versus grün). Bei den Doppel-Knock-out-Mäusen mit NFATc2- und NFATc3-Defizienz (Abb. 3.3 c) scheint die Situation zu den Verhältnissen der Einfach-Knock-out-Mäuse (Abb. 3.3 b) identisch. Es fällt lediglich auf, dass der 12-h-Messwert nach vermeintlicher Stimulation mit α Fas (mit '★' markierter roter Balken in Abb. 3.3 c) praktisch mit dem Wert der *spontanen* Apoptoserate (grüner Balken im selben Diagramm) identisch ist. Es ist daher von einem Experimentierfehler auszugehen, bei dem für diese Kammer der Zellkulturschale die Zugabe von α Fas versäumt worden ist. Bei Zellen mit kompletter NFATc2-Defizienz, aber nur *heterozygotem* NFATc3-Mangel (Abb. 3.3 f) ist im Gegensatz zu Experiment A mit der zusätzlichen Reduktion der Gesamtmenge an NFAT ein weiterer Rückgang der Apoptoseinduktion durch α CD3 zu erkennen (Abb. 3.3: orange Balken in d,e,f). Eine Zeitabhängigkeit dieser Werte (orange in Abb. 3.3 f) ist zwar nicht erkennbar, jedoch liegt die induzierte Apoptoserate (außer nach 48 h) noch deutlich über den spontanen Werten (Abb. 3.3 orange versus grün). In Experiment A setzt die Wirkung der applizierten Antikörper (α CD3, α Fas) bei allen untersuchten Zelltypen erst zwischen 6 und 12 Stunden ein, so dass beim *ersten* Messzeitpunkt (erste Säulenspalte in den Abb. 3.3 a-c) noch keine Unterschiede zwischen den Induktionsarten festzustellen sind. Es lässt sich also bisher festhalten: **Die NFAT-Defizienz (c2 ± c3) beeinträchtigt die CD3-vermittelte, aber nicht die Fas-vermittelte Apoptose.**

⁶Die entsprechenden Zahlenwerte sind der Messwerttabelle in Anhang A.4 zu entnehmen.

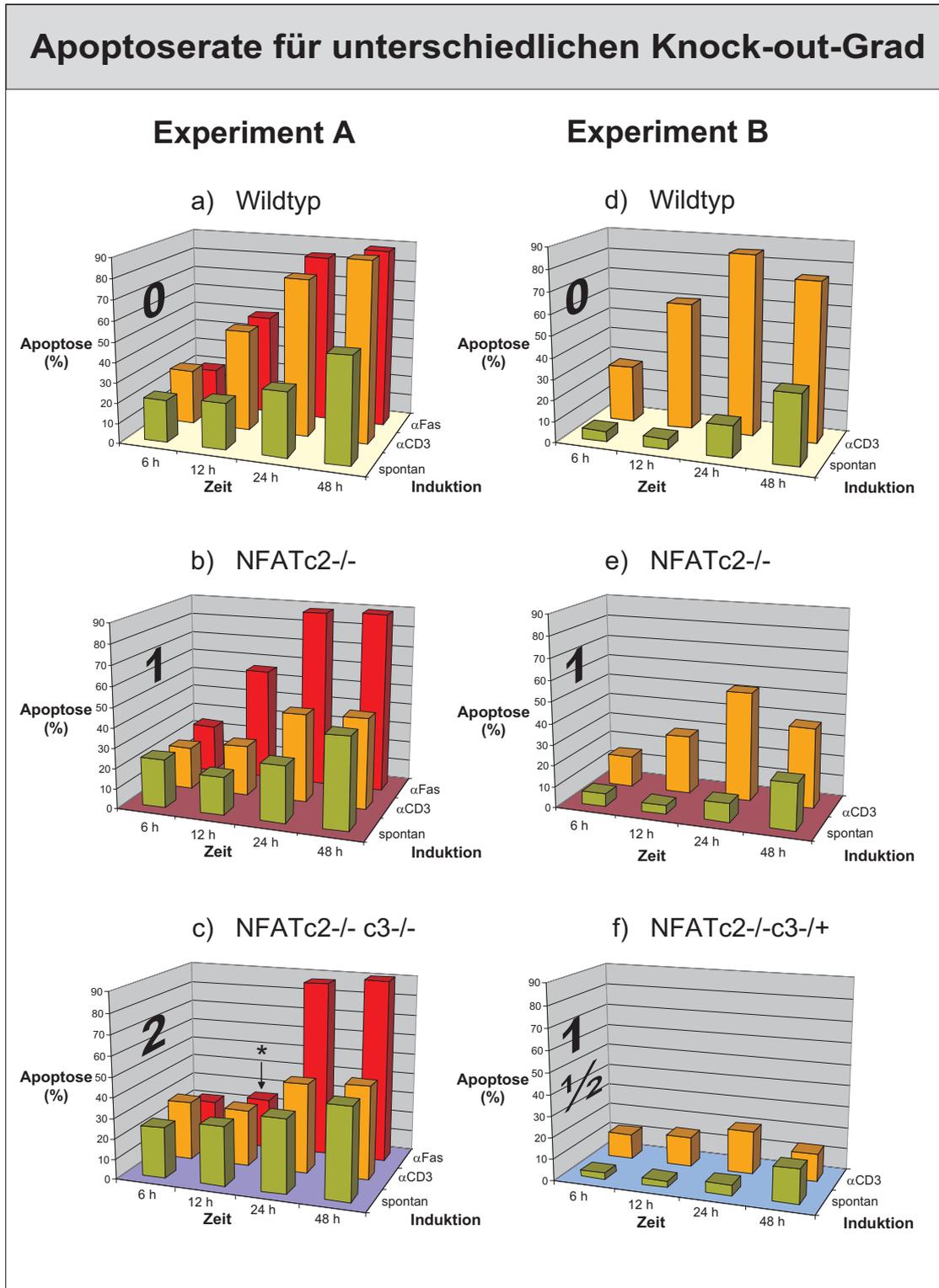


Abbildung 3.3: Für die beiden Experimente A und B wurde je nach Zelltyp (K.o.-Grad an Diagramm'wand') die Apoptoserate (in %) über der Induktionsart (Induktion) und dem Messzeitpunkt (Zeit) nach Induktionsbeginn aufgetragen. Die CD4⁺-T-Zellen stammen dabei aus Lymphknoten von Wildtyp- (a, d) bzw. 'Knock-out'-Mäusen mit folgender NFAT-Defizienz: c2^{-/-}c3^{+/-} (b,e); c2^{-/-}c3^{-/+} (f); c2^{-/-}c3^{-/-} (c). Markierung '★' in (c) weist auf ein Artefakt hin (siehe Text).

Um einen besseren Eindruck vom quantitativen Einfluss der noch vorhandenen NFAT-Menge (NFATc2 + NFATc3) zu gewinnen, sind *dieselben* Werte nochmals, nun nach den unterschiedlichen Induktionsformen gruppiert, zusammengestellt, so dass die Werte für die unterschiedlichen Zellarten direkt nebeneinander aufgetragen werden können (siehe Abb. 3.4).

In den Abbildungen 3.4 a und d, in denen der spontane Verlauf aufgetragen ist, lässt sich im Experiment A (Abb. 3.4 a) zu keiner Zeit eine sichere Abhängigkeit der Apoptoserate vom NFAT-Gehalt der Zellen erkennen. Bei Experiment B hingegen (Abb. 3.4 d) ist – zumindest bei den späteren Zeitpunkten – eine Abnahme der spontanen Apoptoserate mit abnehmender NFAT-Gesamtmenge (c2+c3) eindeutig. Auffällig im Vergleich der beiden Experimente A und B (linke bzw. rechte Spalte in Abb. 3.4) ist das deutlich unterschiedliche *Absolutniveau* der spontanen Apoptoserate, die bei Experiment A im Mittel bei 30 % liegt, im Experiment B dagegen lediglich bei ca. 10 % im Durchschnitt über die Messzeitpunkte und Zellarten. Diese Tatsache erschwert zunächst den unmittelbaren Vergleich der Messwerte zwischen den Experimenten A und B.⁷

Nach Stimulation mit α CD3 erkennt man in Experiment B (Abb. 3.4 e) gut die graduelle Reduktion der induzierten Apoptoserate mit abnehmendem NFAT-Gehalt (c2+c3) (von hinten nach vorne). Auch bei Experiment A ist die verminderte Wirkung von α CD3 bei den Knock-out-Zellen deutlich (Abb. 3.4 b): Die induzierte Apoptoserate sinkt im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen auf ca. die Hälfte – abgesehen vom Zeitpunkt 6 h, an dem wie oben bereits gesagt, die Wirkung der Antikörper (α CD3, α Fas) noch nicht eingesetzt hat. Ein Unterschied zwischen den Einfach- und Doppelt-knock-out-Zellen ist in Abb. 3.4 b (Experiment A) diesbezüglich *nicht* zu erkennen.

Nach Stimulation mit α Fas (Experiment A, Abb. 3.4 c) ist in der induzierten Apoptoserate *kein* Unterschied zwischen den untersuchten Zellarten zu erkennen. Wie bereits erwähnt fällt lediglich der 12-h-Messwert bei den ‘Doppelt-knock-out’-Zellen aus dem Rahmen (Markierung mit ‘*’ in Abb. 3.4 c) und muss daher als Experimentierfehler (siehe oben) gewertet werden.

Aus dem Gesagten lässt sich somit zusätzlich festhalten: **Das Ausmaß der CD3-vermittelten Apoptose korreliert *wahrscheinlich*** (zunächst scheinbar widersprüchliche Ergebnisse in den Experimenten A und B) **mit dem NFAT-Gehalt (c2+c3) der**

⁷Näheres dazu in Abschnitt 3.3.1.

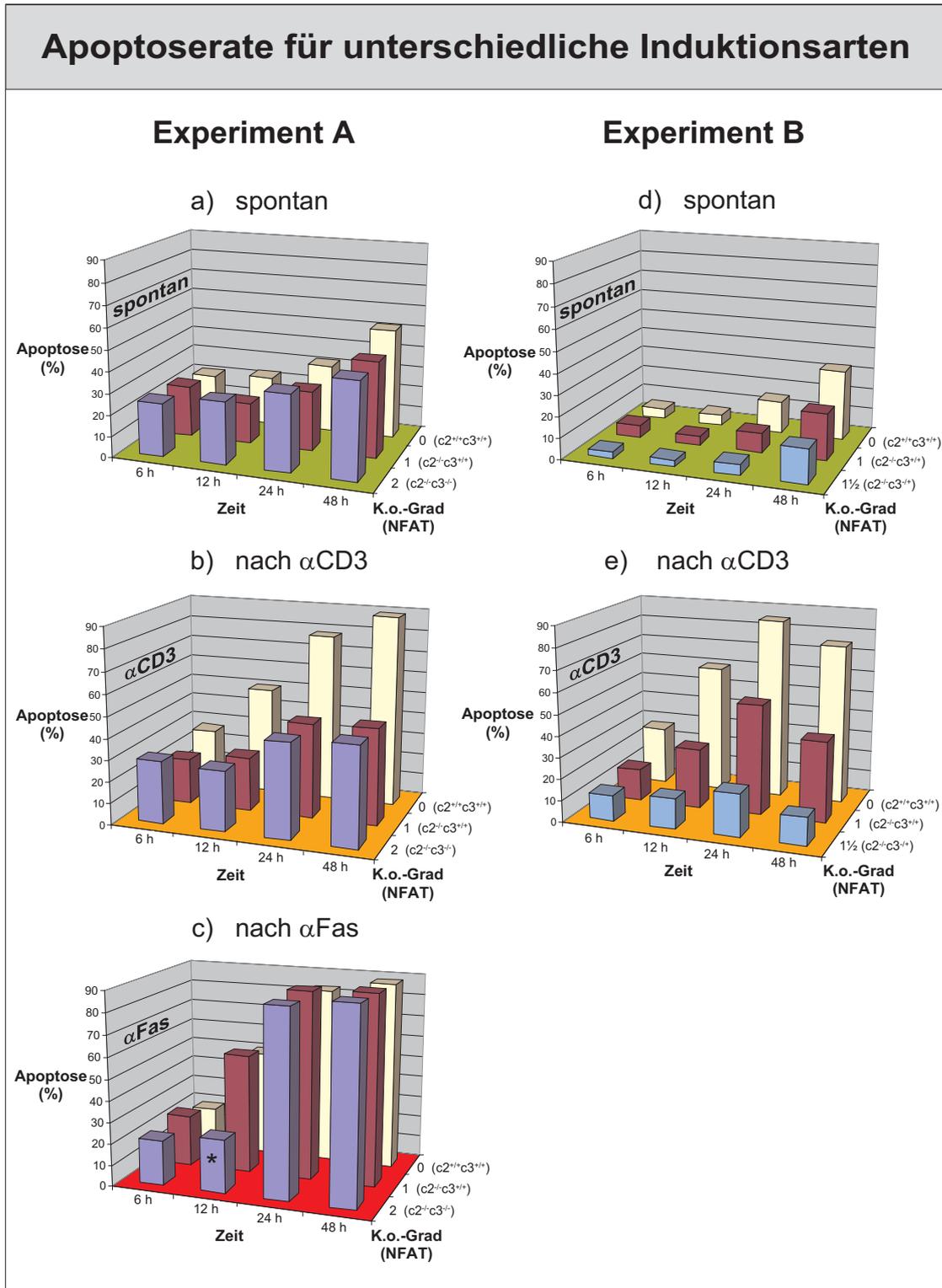


Abbildung 3.4: Für zwei Experimente A und B wurde je nach Induktionsart (spontan, α CD3, α Fas) die Apoptoserate (in %) über dem Zelltyp (K.o.-Grad) und dem Messzeitpunkt (Zeit) nach Induktionsbeginn aufgetragen. Die CD4⁺-T-Zellen stammen dabei aus Lymphknoten von Wildtyp- bzw. 'Knock-out'-Mäusen mit folgender NFAT-Defizienz: $c2^{-/-}c3^{+/+}$; $c2^{-/-}c3^{-/-}$; $c2^{-/-}c3^{-/-}$. Markierung '★' in (c) weist auf ein Artefakt hin (siehe Text).

Zellen.

Bevor dieser Aussage und dem Unterschied der Experimente A und B weiter nachgegangen wird, soll zunächst die *Signifikanz* der bisher gemachten *qualitativen* Aussagen überprüft werden.

3.2.2 Signifikanz der Aussagen

Die Bestimmung des Signifikanz-Niveaus erfolgt mit Hilfe des einseitigen **Student-t-Testes** für verbundene (paarige) Stichproben [42, 1]. Als Grundgesamtheit werden dabei die einzelnen Messzeitpunkte in den beiden Experimenten A und B (wenn möglich, sonst nur A oder B) aufgefasst. Die Nullhypothese besteht jeweils darin, dass *kein* Unterschied in der Apoptoserate zwischen den Parameterkonstellationen (Zellart, Induktionsart) besteht.⁸ Die Interpretation des Signifikanzniveaus p erfolgt dabei nach den üblichen Maßstäben⁹, so dass ab einem $p \leq 0,05$ von einem signifikanten Unterschied auszugehen ist. Der Übersichtlichkeit wegen wird in der nachfolgenden Tabelle 3.1 nicht die Nullhypothese, sondern die vermutete und zu überprüfende Aussage genannt:

Aussage für die Experimente A, B bzw. A und B gemeinsam:		Signifikanzniveau p		
Für Zellen mit ...	ist die Apoptoserate ...	A	B	A + B
Wildtyp	nach α Fas höher als spontan .	0,043	–	–
	nach α CD3 höher als spontan .	0,022	0,009	0,0005
Einfach-k.o.	nach α Fas höher als spontan .	0,035	–	–
	nach α CD3 höher als spontan .	0,170	0,026	0,016
α CD3-Induktion	bei Einfach -k.o. niedriger als bei Wildtyp .	0,022	0,007	0,0002
	bei Doppel -k.o. niedriger als bei Einfach -k.o.	0,095	–	–
	bei 1^{1/2} fach -k.o. niedriger als bei Einfach -k.o.	–	0,031	–

Tabelle 3.1: Signifikanzniveau p nach einseitigem Student-t-Test bei verbundenen Stichproben für qualitative Aussagen über die Apoptoserate der untersuchten Zellarten (Nullhypothese = *kein* Unterschied) für die Experimente A und B getrennt und – wo möglich – auch für A und B gemeinsam. Die Einrahmung weist darauf hin, dass (nur) die zu diesen beiden Werten gehörenden Aussagen *nicht* signifikant sind.

Wie erwartet ist bei Wildtyp-Zellen die Apoptoseinduktion sowohl mittels α Fas als auch durch α CD3 signifikant gegenüber dem spontanen Verlauf erhöht (in letzterem Fall in Zusammenfassung der Experimente sogar *hoch* signifikant bei $p = 0,0005 < 0,001$). Analog ist dies insgesamt auch bei den Einfach-k.o.-Zellen (NFATc2^{-/-}c3^{+/+}) der Fall, nur

⁸Genauer wegen der ‘Einseitigkeit’ des Testes: Kein Unterschied oder aber ein entgegengesetzter als der vermutete.

⁹signifikant $\leftrightarrow p \leq 0,05$; sehr signifikant $\leftrightarrow p \leq 0,01$; hoch signifikant $\leftrightarrow p \leq 0,001$. Dabei stellt p die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art dar, also die Irrtumswahrscheinlichkeit bei Ablehnung der Nullhypothese.

wenn man Experiment A *alleine* betrachtet ergibt sich dort (oberer gerahmter Wert in Tab. 3.1) für die Anwendung der α CD3-Antikörper *kein* signifikanter Anstieg der Apoptoserate gegenüber dem spontanen Verlauf (mehr). Betrachtet man nun den Unterschied der CD3-vermittelten Apoptose zwischen den Zellarten, so ist die Reduktion beim Vergleich ‘Wildtyp’ \rightarrow ‘Einfach-k.o.’ signifikant (insgesamt sogar *hoch* signifikant), bei dem Vergleich ‘Einfach-k.o.’ \rightarrow ‘1 $\frac{1}{2}$ fach-k.o.’ ist die *zusätzliche* Reduktion ebenfalls signifikant. Nur beim Vergleich ‘Einfach-k.o.’ \rightarrow ‘Doppelt-k.o.’ ergibt sich *keine zusätzliche* signifikante Reduktion der Apoptoserate (unterer gerahmter Wert in Tab. 3.1).

Ein Unterschied der durch α Fas induzierten Apoptoserate zwischen den Einfach-k.o.-Zellen und den Wildtyp-Zellen ist *nicht* vorhanden und damit selbstverständlich auch nicht signifikant. Auch bei den Doppelt-k.o.-Zellen ist *weder* im Vergleich zu den Einfach-k.o.- *noch* zu den Wildtyp-Zellen ein signifikanter Abfall der durch α Fas induzierten Apoptoserate zur erkennen ¹⁰.

Zur besseren Einordenbarkeit der scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse aus den Experimenten A (Doppelt-k.o.) und B (1 $\frac{1}{2}$ fach-k.o.) sollen im folgenden Kapitel nun Überlegungen zur besseren Vergleichbarkeit der Messwerte aus den beiden verschiedenen Experimenten erfolgen.

3.3 NFAT und AICD korrelieren quantitativ miteinander

3.3.1 Bereinigung um die spontane Apoptoserate

Ein bereits erwähnter, augenfälliger Unterschied der beiden Experimente A und B ist das unterschiedliche Ausmaß der *spontanen* Apoptoserate (Unterschied ca. Faktor 3). Um eine sinnvolle Vergleichbarkeit der unterschiedlich stark ‘verrauschten’ Messwerte nach Induktion in Experiment A und B zu erhalten, soll die spontane Apoptoserate aus der Apoptoserate nach Induktion ‘herausgerechnet’ werden. Eine einfache Subtraktion der spontanen Rate von den Werten nach Induktion (α CD3 bzw. α Fas) wird jedoch vermutlich der tatsächlichen Situation nicht gerecht.

Unter der Annahme, dass die *spontane* Apoptoserate **unabhängig** von der *induzierten* Apoptoserate ist (z.B. weil sie auf andere Weise ausgelöst ist), ergibt sich aus den Überlegungen in Anhang A.2 folgende Formel zur Umrechnung auf bereinigte Messwer-

¹⁰Auch trotz des Experimentierfehlers beim 12-h-Wert der NFATc2^{-/-}c3^{-/-}-Zellen besteht kein signifikanter Unterschied zu den anderen Zellarten.

te¹¹ (Angabe jeweils in %):

$$\text{Apoptoserate}_{\text{bereinigt}} = \frac{\text{Apoptoserate}_{\text{induziert}} - \text{Apoptoserate}_{\text{spontan}}}{100 - \text{Apoptoserate}_{\text{spontan}}} \cdot 100 [\%]$$

In Abbildung 3.5 sind für den 24-h-Messzeitpunkt die bereinigten Werte aus beiden Experimenten (ggf. als Mittelwert) aufgetragen. Die Fehlerangaben stammen dabei aus Überlegungen zur Messgenauigkeit und entsprechender Fehlerrechnung nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz¹².

Vergleich bereinigter Werte 24 h nach Induktion (Experimente A+B)

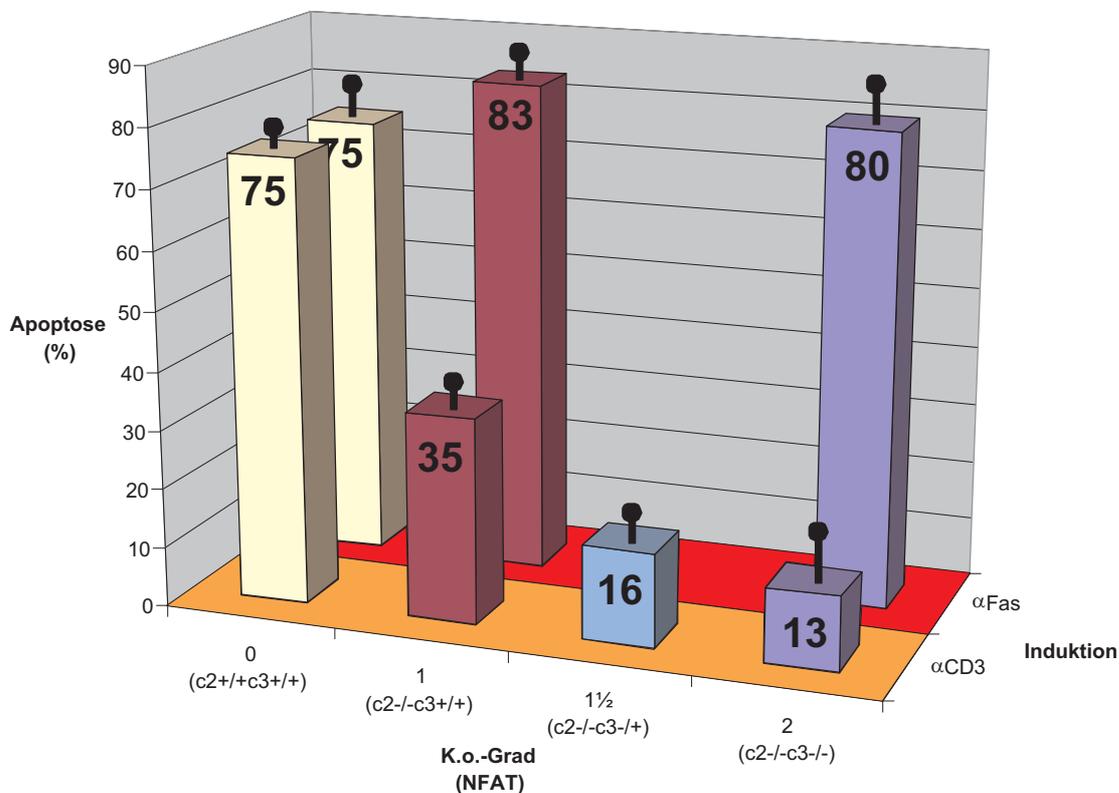


Abbildung 3.5: Für die Experimente A und B zusammengefasst (ggf. als Mittelwert) ist die um die spontane Apoptoserate *bereinigte* induzierte Apoptoserate (in %, Formel dazu im Text) über der Induktionsart (αCD3, αFas) und über dem Zelltyp (K.o.-Grad) für den Messzeitpunkt 24 h nach Induktionsbeginn aufgetragen. Die CD4⁺-T-Zellen stammen dabei aus Lymphknoten von Wildtyp- bzw. ‘Knock-out’-Mäusen mit folgender NFAT-Defizienz: c2^{-/-}c3^{+/+}; c2^{-/-}c3^{-/+}; c2^{-/-}c3^{-/-}. Die schwarzen ‘Fehlerbalken’ (Striche mit Kugel) geben dabei den entsprechenden Standardfehler unter Berücksichtigung von Messgenauigkeit und Fehlerfortpflanzungsgesetz an.

Nach dieser Korrektur und Zusammenfassung der beiden Experimente ergibt sich also nun

¹¹Die bereinigten Werte sind in der Messwerttabelle in Anhang A.4 rot dargestellt.

¹²Für Einzelheiten zur Messgenauigkeit und Fehlerrechnung siehe Anhang A.4.

tatsächlich mit jeder weiteren Abnahme des NFAT-Gehaltes ($c2+c3$) der Zellen auch eine weitere Abnahme der CD3-vermittelten Apoptoserate. Allerdings muss einschränkend festgehalten werden, dass unter Berücksichtigung der angegebenen Fehlergrenzen der Unterschied bei diesem Messzeitpunkt teilweise *nicht* signifikant ist. Ungeklärt ist zunächst weiterhin, ob das *Ausmaß* der jeweiligen Apoptosereduktion auch mit dem mengenmäßigen *Ausmaß* der NFAT-Reduktion übereinstimmt. Der nächste Abschnitt soll diesen Aspekt nun näher beleuchten.

3.3.2 Vergleich mit dem NFAT-Gehalt der Zellen

Eine quantitative Bestimmung der Menge an unterschiedlichen NFAT-Faktoren (hier NFATc2 und NFATc3) – wenn auch nur relativ zueinander – ist nicht nur praktisch, sondern bereits *prinzipiell* schwierig [49]. Zum einen ist der (relative) Gehalt neben der Zellart in erster Linie vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig, zum anderen sind die zur Erkennung und damit Bestimmung notwendigen Antikörper (auf Proteinebene) bzw. Primer (auf mRNA-Ebene) naturgemäß von einander verschieden und daher zwangsläufig von unterschiedlicher Affinität zu ihrer jeweiligen Zielstruktur. Der Versuch, den relativen NFAT-Gehalt (NFATc2 : NFATc3) trotz dieser Einschränkungen abzuschätzen, darf daher nicht überbewertet werden und ist nur als grober Anhaltspunkt zu verstehen.

Aus der Veröffentlichung von RANGER ET AL. [37, Abbildung 1] kann der Abdruck eines Blots entnommen werden, in dem unter anderem der Gehalt von NFATc1, NFATc2 und NFATc3 aus ruhenden, wildtypischen T-Helfer-Zellen auf RNA-Ebene dargestellt ist. Eine photometrische Analyse (Einzelheiten dazu sind in Anhang A.3 dargestellt) ergibt dabei einen relativen Gehalt NFATc2 : NFATc3 von ca. 9 : 7. Will man nur die Gesamtmenge der zwei Formen NFATc2 + NFATc3 berücksichtigen, kann man den Gehalt der Wildtyp-Zellen (NFATc2^{+/+} c3^{+/+}) im Sinne einer Normierung mit 100 % definieren und den der ‘Doppel-knock-out’-Zellen (NFATc2^{-/-} c3^{-/-}) mit 0 % annehmen. Für die anderen Knock-out-Grade ergeben sich dann entsprechend des obigen Verhältnisses folgende Werte für den relativen NFAT-Gehalt ($c2+c3$):

Zelltyp:	NFAT	$c2^{+/+}c3^{+/+}$	$c2^{-/-}c3^{+/+}$	$c2^{-/-}c3^{-/+}$	$c2^{-/-}c3^{-/-}$
K.o.-Grad:		0	1	1 ^{1/2}	2
NFAT-Gehalt ($c2+c3$):		100 %	43 % ± 5 %	22 % ± 4 %	0 %

Die Fehlerangabe berücksichtigt dabei nur die Ungenauigkeit der Auswertung¹³ der zi-

¹³Siehe dazu Anhang A.3.

tierten Graphik, *nicht* jedoch methodische Unsicherheiten bei ihrer Erstellung, die zwar unbekannt sind, aber gegebenenfalls relevant sein können. Die obigen Zahlenwerte sind daher – wie bereits eingangs gesagt – nur als *grobe* Anhaltspunkte zu verstehen.

Um einen quantitativen Vergleich der gerade bestimmten, relativen NFAT-Gehalte der untersuchten Zelltypen mit den entsprechenden *relativen* Apoptoseraten (d.h. deren quantitativem Verhältnis untereinander) zu erleichtern, empfiehlt es sich, die Apoptoserate der Wildtyp-Zellen ebenfalls auf 100 % zu normieren.¹⁴ In Abbildung 3.6 sind die Mittelwerte (über die Messzeitpunkte beider Experimente A und B) dieser normierten (und zuvor bzgl. der spontanen Rate bereinigten) Apoptoseraten nach Induktion mit α CD3 neben dem Gehalt an NFATc2 + NFATc3 (blaue Balken in Abb. 3.6) aufgetragen. Die unterschiedlichen grünen Balken ergeben sich dabei aus der Berücksichtigung unterschiedlich vieler Messzeitpunkte bei der Mittelwertbildung. Die Fehlerbalken der Apoptoseraten stammen dabei aus einer Abschätzung der Messgenauigkeit und anschließender Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes für ‘Bereinigung’ und Normierung.¹⁵

Bei der Mittelwertbildung sollten die 6-h-Messwerte besser *nicht* berücksichtigt werden, da bereits oben festgestellt wurde (insbesondere für Experiment A), dass zu diesem Zeitpunkt die Wirkung der α CD3-Antikörper noch nicht eingesetzt hat (siehe dazu auch Abb. 3.3, Experiment A).¹⁶ Bezüglich der 48-h-Werte wurde schon erwähnt, dass sich die Wirkung der α CD3-Antikörper bereits im *Abklingen* befindet (insbesondere in Experiment B, siehe dazu Abb. 3.3). Daher scheint auch das Ausschließen *dieser* Datenpunkte im aktuellen Zusammenhang gerechtfertigt. Berücksichtigt man also nur die als zuverlässig erachteten Datenpunkte (12-h- und 24-h-Werte in Experiment A und B), so ergibt sich (jeweils dunkelster grüner Balken in Abb. 3.6) innerhalb der angegebenen Fehlergrenzen eine recht gute Übereinstimmung der relativen Apoptoseraten (bereinigt jeweils um die spontane Rate) mit dem jeweils abgeschätzten relativen NFAT-Gehalt der Zellen. Es lässt sich also Folgendes festhalten: **Im Rahmen der Messgenauigkeit und unter dem Vorbehalt der methodischen Einschränkungen ist die CD3-induzierte Apoptoserate dem Gesamt-NFAT-Gehalt der Formen NFATc2 und NFATc3 *direkt proportional*.** Man sollte dabei jedoch nicht vergessen, dass die vor-

¹⁴Grüne Werte in der Messwerttabelle in Anhang A.4.

¹⁵Siehe dazu Anhang A.4.

¹⁶Die hellsten grünen Balken geben – wie in der Legende zu Abb. 3.6 vermerkt – die Apoptoseraten unter Berücksichtigung *aller* Messzeitpunkte wieder, während bei den mittleren grünen Balken die 6-h-Werte unberücksichtigt bleiben.

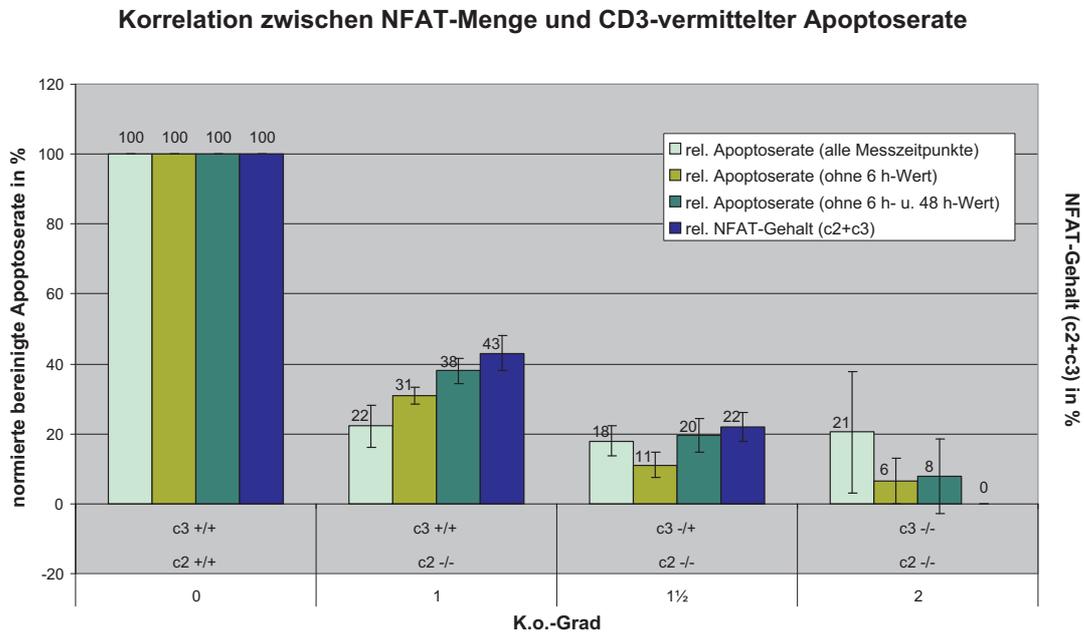


Abbildung 3.6: Korrelation von NFAT-Menge (c2+c3) und CD3-vermittelter Apoptoserate. Aufgetragen sind für die angegebenen Zelltypen die bzgl. der spontanen Rate bereinigten und bzgl. der Wildtyp-Zellen normierten Apoptoseraten nach α CD3-Induktion als Mittelwerte über unterschiedlich viele Messzeitpunkte (der Experimente A und B gemeinsam) neben dem geschätzten NFAT-Gehalt der jeweiligen Zelltypen. Die Fehlerbalken ergeben sich bei den Apoptoseraten aus einer Abschätzung der Messgenauigkeit mit anschließender Fehlerrechnung, die der relativen NFAT-Mengen aus der Ungenauigkeit der graphischen Auswertung *ohne* Berücksichtigung evtl. methodischer Unsicherheiten.

liegende Datenmenge für eine fundierte Untermauerung der gemachten Aussage nicht ausreichend ist, so dass diesbezüglich weitere Forschungsarbeit notwendig bleibt. Selbstverständlich gelten die hier gemachten Aussagen streng genommen nur für das untersuchte System, also CD4⁺-T-Zellen aus den Lymphknoten von Mäusen.

Kapitel 4

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der NFAT-Transkriptionsfaktoren NFATc2 und NFATc3 beim AICD als Sonderform der Apoptose von peripheren CD4⁺-T-Lymphozyten aus Lymphknoten von Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich aus dem Vergleich von unterschiedlichen NFAT-defizienten ‘Knock-out’-Tieren, dass die CD3-vermittelte Apoptose (AICD) – im Gegensatz zur Fas-vermittelten – mit dem Gesamtgehalt der Zelle an NFATc2 und NFATc3 korreliert und diesbezüglich eine direkte Proportionalität angenommen werden kann. Dazu waren zwei unabhängige Experimente mit teilweise unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt worden. Zunächst soll auf einige besondere Aspekte dieser Experimente eingegangen werden, bevor dann grundlegende Fragestellungen bezüglich der Methodik und der Einordnung ins Gesamtbild des AICD diskutiert werden. Abschließend soll ein Ausblick einige der mit dieser Arbeit assoziierten, offenen Fragestellungen beleuchten.

4.1 Spezifische Aspekte der durchgeführten Experimente

4.1.1 Unterschied der spontanen Apoptoserate

Zwischen den beiden Experimenten A und B (siehe Abschnitt 3.2.1) ergab sich eine spontane Apoptoserate (zeitabhängig) der *nicht* induzierten Zellen in einem Verhältnis von ca. 30 % : 10 % zueinander. Dabei lagen die Absolutwerte der *induzierten* Apoptoseraten bei beiden Experimenten in vergleichbaren Bereichen (siehe Messwerttabelle in Anhang A.4). Dieser Unterschied von Faktor 3 ist signifikant. Die Möglichkeit interindividueller Schwankungen, z.B. in Abhängigkeit vom Infektstatus und der immunologischen Vergangenheit

der Tiere, scheidet weitgehend aus, da die Zellen der jeweils parallel untersuchten Tiere erstaunlich *gleiche* spontane Apoptoseraten zeigten. Naheliegender ist es, die Ursache im Handling der Zellen und bei den applizierten Substanzen (insbesondere des Mediums, der Antikörper α CD3, α CD28 und des Interleukin 2) zu suchen. Auch die Zelldichte in den Kulturschalen könnte ausschlaggebend sein. Soweit feststellbar waren bei beiden Experimenten alle äußeren Bedingungen vergleichbar, einzig das **Kulturmedium** während der Zeit der initialen Stimulation und Expansion (siehe Kapitel 2) unterschied sich in beiden Experimenten (bei A: RPMI 1640; bei B: X-VIVO 15; Einzelheiten siehe Anhang B.2), so dass hier vermutlich die Ursache der unterschiedlichen spontanen Apoptoserate liegen dürfte.

4.1.2 Gleiche Apoptoseraten bei Einfach- und Doppelt-k.o.-Mäusen

Im Gegensatz zu der zusätzlichen signifikanten Reduktion der CD3-vermittelten Apoptoserate beim Vergleich von Einfach- (NFATc2^{-/-}c3^{+/+}) zu 1^{1/2} fach-k.o.-Zellen (NFATc2^{-/-}c3^{-/+}) in Experiment B zeigte sich praktisch keine zusätzliche Reduktion in Experiment A zwischen den Einfach- (NFATc2^{-/-}c3^{+/+}) und den Doppelt-k.o.-Zellen (NFATc2^{-/-}c3^{-/-}). Zur Erklärung dieses Sachverhaltes sind unterschiedliche Ansätze dankbar:

- (a) Es wurde bei beiden Zelltypen kein α CD3 zugegeben (Experimentierfehler bei A).
- (b) Es bestand in Wirklichkeit kein Unterschied zwischen den als Einfach- und Doppelt-k.o. bezeichneten Zellen (falsche Genotypisierung bei A).
- (c) Bei den 1^{1/2} fach-k.o.-Zellen wurde α CD3 vergessen (Experimentierfehler bei B).
- (d) Die hohe spontane Apoptoserate bei A ist Schuld, dass ein doch vorhandener Unterschied nicht erkannt wird (systematischer Fehler).
- (e) Es handelt sich nur um statistische Schwankungen, die einen doch vorhandenen Unterschied verschleiern (Zufall).

Zur Beurteilung von Punkt (a) muss daran erinnert werden (siehe Kapitel 2), dass zur Induktion der Apoptose *plattengebundene* (siehe auch Anhang B) α CD3-Antikörper und für jeden Messzeitpunkt eine eigene Kammer der Zellkulturplatten verwendet wurden. Dass also im Sinne eines Experimentierfehlers vergessen wurde, die Hälfte aller Kammern (also 8 Stück) mit α CD3-Antikörpern zu beschicken (die andere Hälfte für die Wildtyp-Zellen aber nicht), ist praktisch ausgeschlossen. Auch von den Messergebnissen her (der 24-h-Wert nach α CD3-Stimulation unterscheidet sich bei beiden Zelltypen deutlich von der spontanen Apoptoserate, siehe Abb. 3.3) scheint diese Erklärung unwahrscheinlich.

Allerdings soll nicht verschwiegen werden, dass für das Experiment A *alleine* weder bei den Einfach- noch bei den Doppelt-k.o.-Zellen der Unterschied zwischen der spontanen und der α CD3-vermittelten Apoptoserate signifikant ist (siehe Abb. 3.3 und Tab. 3.1).

Um Hypothese (b) beurteilen zu können, soll zunächst der ‘Southern Blot’ bezüglich NFATc3 gezeigt werden, der zur Genotypisierung der verwendeten Mäuse (DNA aus Schwanzmaterial der Tiere, amplifiziert mittels PCR) in Experiment A führte (siehe Abbildung 4.1). Alle Mäuse dieses Wurfes waren zusätzlich vom NFATc2^{-/-}-Genotyp.

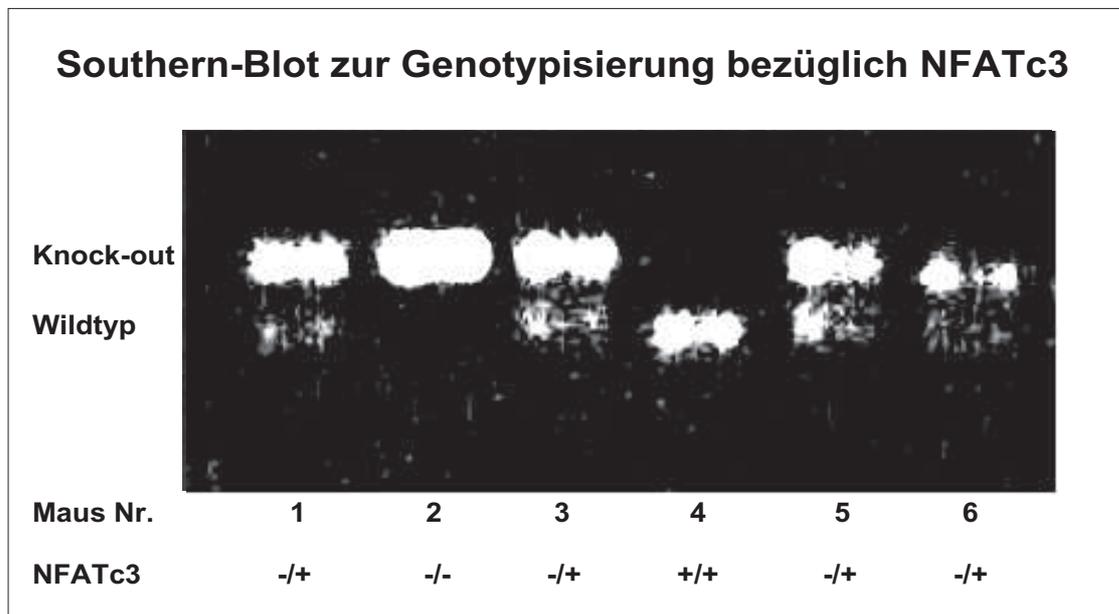


Abbildung 4.1: ‘Southern-Blot’ zur Detektion des NFATc3-Genotyps¹. Die DNA aus Schwanzmaterial der Mäuse (für Experiment A) wurde zuvor mittels PCR amplifiziert. Jede Spalte entspricht einer Maus des Wurfes. Die *obere* Bande repräsentiert den Knock-out-Genotyp bzgl. NFATc3, die *untere* Bande den Wildtyp.

Man erkennt, dass vier der sechs Mäuse dieses Wurfes bezüglich NFATc3 heterozygot sind (bei Nr. 1,3,5 und 6 sind beide Banden in Abb. 4.1(schwach) vertreten), eine Maus (Nr. 2) ist homozygot ‘ausgeknockt’ (NFATc3^{-/-}, also die Doppel-k.o.-Maus in Experiment A) und eine Maus (Nr. 4) ist bezüglich NFATc3 wildtypisch (also die Einfach-k.o.-Maus in Experiment A). Falls also die beiden verwendeten, als NFAT-defizient bezeichneten Tiere in Experiment A *dieselbe* Genausstattung besessen hätten, könnte es sich in diesem Wurf nur um Tiere des Typs NFATc2^{-/-}c3^{-/+} handeln. Dies würde aber bedeuten, dass gleich *beide* Tiere verwechselt worden wären, was doch sehr unwahrscheinlich erscheint.

¹Darstellung des Blots mit freundlicher Genehmigung von T. TWARDZIK aus unserem Labor.

Hinter Aussage (c) verbirgt sich der Gedanke, dass bei Experiment B zwischen den beiden Knock-out-Tieren eigentlich ebenfalls kein Unterschied im AICD bestehen könnte, und die gezeigte zusätzliche Reduktion von einer fehlenden Induktion bei den NFATc2^{-/-}c3^{-/+}-Zellen herrühren könnte. Abbildung 3.3 f zeigt im direkten Vergleich die spontanen und induzierten Apoptoseraten für diesen Zelltyp. Da ihr Unterschied (zumindest für die ersten drei Messpunkte) signifikant ist, ist Hypothese (c) sehr unwahrscheinlich.

Kann die vorliegende, relativ hohe spontane Apoptoserate den (evtl. doch tatsächlich vorhandenen) Unterschied im AICD der Einfach- und Doppelt-k.o.-Zellen verschleiern haben? Gemäß den Überlegungen in Anhang A.2 ist davon auszugehen, dass die *spontane* und die *induzierte* Apoptoserate voneinander *unabhängig* sind. Ein einfaches ‘Versinken’ der induzierten Raten unter das Niveau der spontanen Rate ist daher *nicht* zu erwarten. Je höher aber die spontane Rate ist, desto mehr werden die induzierten Werte ‘gedrückt’ (denn z.B. 30 % spontane Rate und 20 % induzierte Rate führen nicht zu 50 %, sondern nur zu einer gemessenen Rate von 44 %). Sie ‘ragen’ also gewissermaßen immer weniger aus dem ‘See’ der spontanen Rate heraus (im Beispiel nur um 14 %-Punkte, statt wie z.B. um 18 %-Punkte bei einer spontanen Rate von nur 10 %). Berücksichtigt man dazu noch das ‘Rauschen’ der spontanen Rate (± 5 %-Punkte) und die Messungenauigkeit der induzierten Rate (ebenfalls ± 5 %-Punkte), kann tatsächlich ein eventuell vorhandener Unterschied nicht mehr als signifikant erkannt werden.

Die gerade dargelegten Ausführungen haben neben dem Punkt (d) den Punkt (e) bereits mitbeantwortet, so dass als Fazit festgehalten werden kann: Eine hohe spontane Apoptoserate überdeckt zwar die induzierten Werte nicht, macht aber – zusammen mit der immer vorhandenen Messungenauigkeit – die Auswertung schwieriger (man erkennt auf den ‘ersten Blick’ die Verhältnisse nicht sicher) und reduziert das Signifikanzniveau beim Vergleich der stärker ‘verrauschten’ Werte. Eine Kombination der Erklärungsansätze (d) und (e) erscheint demnach als plausibelste Begründung für den kaum zu beobachtenden Unterschied im AICD der Einfach- und Doppelt-k.o.-Zellen bei Experiment A.

4.2 Allgemeine Aspekte bezüglich der Methodik

4.2.1 (Un-)Mittelbarkeit der Wirkung des NFAT-Mangels

Die beobachtete Reduktion des AICD bei NFAT-defizienten ‘Knock-out’-Tieren kann – wie angenommen – eine **unmittelbare** Folge der fehlenden NFAT-Faktoren in den Signalwegen der Zelle zum *aktuellen* Zeitpunkt der Auslösung des AICD sein. Alternativ könnte aber auch der NFAT-Mangel *während der Entwicklung* der Zelle (oder der Maus) diese so beeinträchtigt oder verändert haben, dass auf Grund dieses anderen Zustandes die Auslösbarkeit des AICD beeinträchtigt ist. Demnach wäre dann nur die NFAT-Ausstattung während des *Zeitintervalles* der Reifung der Zelle ausschlaggebend und nicht die zum *Zeitpunkt* der Apoptoseinduktion. Die Reduktion des AICD wäre dann also nur **mittelbare** Folge eines früheren NFAT-Mangels. Auch beliebig gewichtete Kombinationen dieser beiden Thesen sind natürlich denkbar.

Die beobachtete Proportionalität der Beziehung NFAT-Gehalt \leftrightarrow AICD-Ausmaß legt das Vorliegen eines Parameters nahe, dessen Quantität letztlich ausschlaggebend ist. Im Falle der ersten Hypothese (Unmittelbarkeit) ist dies augenscheinlich der NFAT-Gesamtgehalt an den Faktoren NFATc2 und NFATc3. Bei der zweiten Hypothese (Mittelbarkeit) kann man sich zwar gut eine prinzipielle Veränderung der Auslöseschwelle des AICD vorstellen, aber wer bzw. was – wenn nicht der NFAT-Gehalt selbst – kann die Rolle des verantwortlichen, kontinuierlichen Parameters übernehmen? Derzeit gibt es aus Sicht der Experimente keine Notwendigkeit, dieses zweite und kompliziertere Modell anzunehmen. Experimentelle Möglichkeiten, diesen Sachverhalt zu klären, bestehen darin, den NFAT-Gehalt erst *nach* der Reifung zu verringern (nachträgliche Genabschaltung oder nachträgliches Einschleusen von dominant negativen² NFAT-Mutationen) oder bei ‘NFAT-Knock-out’-Tieren den NFAT-Mangel nach der Reifung wieder zu *beheben* (Zugabe von NFAT von außen oder nachträgliches Einschleusen intakter NFAT-Gene) bzw. von vornherein die Wirkung einer nachträglich *vermehrten* NFAT-Produktion zu untersuchen.

Den Gedanken der nachträglichen Reparation bei ‘Knock-out’-Tieren verfolgten dabei RENGARAJAN ET AL. in [39]. Dort wurden murine Doppel-k.o.-Lymphknotenzellen (NFATc2^{-/-} c3^{-/-}) mit einem Luciferase-Reporterplasmid unter der Kontrolle des FasL-

²Überexpression eines artifiziellen Proteins, das die Funktion des zu untersuchenden Proteins stört, z.B. durch funktionslose kompetitive Bindung der zugehörigen Zielstruktur.

Promotors transfiziert. Eine Koexpression von NFATc2 führte zu einer Verdopplung der Aktivität des Promotors und ermöglichte eine Stimulierbarkeit (auf das Vierfache) mit Calciumliberatoren³. Die fehlende Aktivität des FasL-Promotors in der NFAT-defizienten Zelle wird also durch zusätzliches Einbringen von NFATc2 behoben, eine Induktion des AICD sollte also dann möglich sein (wurde aber in [39] nicht nachgewiesen).

In unserer Arbeitsgruppe wurde diesbezüglich der Ansatz verfolgt, die Wirkung einer (nach Abschluss der Reifung) *gesteigerten* NFAT-Menge auf die Apoptoserate zu untersuchen [45, 5]. Dazu wurden CD4⁺-T-Zellen aus Lymphknoten von (bzgl. der NFAT-Ausstattung wildtypischen) Mäusen mit Retroviren infiziert, die dann das so eingebrachte NFATc2-Gen (unter der Kontrolle des Zytomegalie-Virus-Promotors) exprimierten. Nach Induktion der Apoptose mit α CD3 wurde dann die Apoptoserate im Vergleich zu Zellen, die mit dem Leer-Vektor infiziert waren, gemessen (siehe [45] bzw. [5]):

Apoptoserate	Leer-Vektor	NFATc2-Vektor
spontan	10 %	16 %
nach α CD3	41 %	84 %

Es zeigte sich also sowohl eine deutliche Steigerung der *spontanen* als auch insbesondere eine Verdopplung der *induzierten* Apoptoserate. Dies unterstützt die These, dass **der AICD unmittelbar vom NFAT-Gehalt⁴ – zum Zeitpunkt der Auslösung** und nicht während der Reifung der Zelle – **abhängt**.

Ein Versuch, den wirksamen NFAT-Gehalt durch Einbringung dominant negativer Genprodukte mittels Retroviren erst im Nachhinein zu verringern, war im Rahmen dieser Arbeit unternommen worden, scheiterte aber an einer ungenügenden Infektionsrate der Zellen. Erst der Übergang zu transgenen Mäusen eines T-Zell-Rezeptor-Klons und der Stimulation über das zugehörige Antigen konnte die genannten Schwierigkeiten überkommen (siehe dazu [45]).

4.2.2 Beschränkte Gültigkeit des Modellsystems

In der vorliegenden Arbeit wurden T-Helfer-Zellen (CD4⁺) aus Lymphknoten von Mäusen untersucht. Streng genommen beziehen sich demnach alle gemachten Aussagen bezüglich der NFAT-Transkriptionsfaktoren und ihrer Beziehung zum AICD nur auf *diesen* Zelltyp.

³PMA und Inomycin

⁴Eine quantitative Einordnung in die Werte dieser Arbeit ist auf Grund des unterschiedlichen Promotors (NFATc2-Promotor der Maus \leftrightarrow Zytomegalievirus-Promotor) nicht möglich, da die Steigerung der NFAT-Menge nicht bekannt ist.

Die Hoffnung bei der Untersuchung eines Modellsystems ist stets auf die Möglichkeit einer Verallgemeinerung gerichtet (anderer Reifungsgrad oder andere Lokalisation der Zelle, andere Spezies, anderer Zelltyp). Dass dabei aber große Vorsicht geboten ist, zeigen die Ergebnisse von OUKKA ET AL. [33]. Bei der Untersuchung von Doppelt-positiven Thymozyten ($CD4^+$, $CD8^+$) – also den unreifen Vorläuferzellen der (z.B. $CD4^+$) T-Lymphozyten – aus dem Thymus von NFATc3-knock-out-Mäusen zeigte sich eine *gesteigerte* Apoptose nach CD3-vermittelter Induktion. Demnach scheint also die Folge eines NFATc3-Mangels in *doppelt*-positiven ($CD4^+$, $CD8^+$) und in *einfach*-positiven ($CD4^+$)-T-Zellen genau entgegengesetzt auszufallen (Steigerung \leftrightarrow Reduktion des AICD). Bei den Thymozyten war die Reduktion des NFATc3 (dominierender NFAT-Typ dieser Zellen) mit einer *Herunterregulation* des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 assoziiert. Möglicherweise ist während der Entwicklung (Bcl-2-Expression gering) die Kontrolle des Bcl-2-Promotors NFAT-abhängig, wohingegen bei reifen Zellen die Bcl-2-Expression konstitutiv hochreguliert ist und evtl. keiner NFAT-Stimulation mehr bedarf. Einzelheiten dazu sind jedoch nicht erforscht, bis zu ihrer Klärung halten wir aber fest: Der Reifegrad der untersuchten Zellen (assoziiert mit der dadurch unterschiedlichen Lokalisation) stellt sich bereits als kritischer Parameter für die Beziehung NFAT-Menge \leftrightarrow AICD dar.

Auf der anderen Seite konnten KONDO ET AL. dagegen zeigen, dass NFATc2 auch in (humanen) Burkitt-Lymphom-B-Zellen eine Schlüsselrolle im AICD (ausgelöst über Aktivierung des B-Zell-Rezeptors) spielt [20]. Die pro-apoptotische Bedeutung von NFATc2 beschränkt sich demnach nicht auf T-Zellen oder Mäuse, allerdings muss jede Erweiterung des Gültigkeitsbereiches der gemachten Aussagen – wie bereits gesagt – im Einzelfall entsprechend überprüft werden.

4.3 Beziehung zum Gesamtbild des AICD

4.3.1 Implikationen der Proportionalität

Die in dieser Arbeit dargelegte Proportionalität zwischen dem NFAT-Gehalt und dem AICD (bei T-Helfer-Zellen aus den Lymphknoten von Mäusen) impliziert einige Schlussfolgerungen, die nun dargelegt werden sollen.

Der im letzten Satz angesprochene NFAT-Gehalt bezieht sich auf die Gesamtmenge der beiden Faktoren NFATc2 und NFATc3. Die Proportionalität beinhaltet den Bereich

von 0 % bis 100 %, also *kein* NFATc2/c3 (0 %) bedeutet *kein* AICD (0 %) und *volle* Menge an NFATc2/c3 (100 %) bedeutet *voller* Umfang des AICD (100 %). Dies impliziert, dass **die übrigen NFAT-Formen (NFATc1, NFATc4) keinen Einfluss auf den AICD ausüben**. Aus der Literatur ist bekannt, dass NFATc4 in den Lymphozyten rein quantitativ kaum eine Rolle spielt [43, 39]. Dem Faktor NFATc1, der sehr wohl in beträchtlichem Umfang in Lymphozyten auftritt, wird eine positive, proliferative Wirkung im Sinne einer *Verstärkung* der Immunantwort zugeschrieben [37, 34, 36], ohne einen signifikanten Einfluss auf den Zelluntergang mittels AICD. Die in dieser Arbeit beschriebene Proportionalität zwischen der Gesamtmenge an NFATc2+c3 mit dem Ausmaß des AICD bestätigt also die aus der Literatur nahegelegte Vermutung, dass NFATc1 und NFATc4 bezüglich des AICD der T-Lymphozyten ($CD4^+$) *keine* Rolle spielen. NFATc4-defiziente Mäuse zeigen weder makroskopische noch mikroskopische Auffälligkeiten [9], allerdings wurde die Apoptose von T-Lymphozyten bei diesen Tieren (in [9]) nicht explizit untersucht. Auch bei den NFATc1-defizienten T-Lymphozyten [36], bei denen sich eine beeinträchtigte Aktivierung zeigt, wurde in [36] eine Auswirkung auf die Apoptose nicht direkt untersucht.⁵ Bei *Überexpression* von NFATc1 [5, 45] hängt die Wirkung von der genauen Isoform ab: Bei NFATc1/A zeigt sich keine Veränderung der AICD-Rate, bei NFATc1/C hingegen ein Anstieg der Apoptose, vergleichbar mit dem bei Überexpression von NFATc2 [5]. Aus der Tatsache, dass bei kompletter NFATc2/c3-Defizienz praktisch keine induzierte Apoptosesteigerung mehr auftritt (Messwert vereinbar mit 0 % im Rahmen der Messgenauigkeit), lässt sich folgern, dass in vivo der Isoform NFATc1/C im Rahmen des AICD *keine* entscheidende Rolle zukommen kann. RANGER ET AL. berichten dementsprechend in [37] auch von einer Prädominanz der Isoform NFATc1/A in den untersuchten Zellen. Bezüglich NFATc1/C wäre prinzipiell – nach den Daten dieser Arbeit – lediglich eine Verstärkerfunktion denkbar, jedoch keine mit den Faktoren NFATc2/c3 gleichwertige Wirkungsweise (also keine additive, sondern eine *multiplikative* Wirkung).

Neben den *Unterschieden* der NFAT-Faktoren ($c2,c3 \leftrightarrow c1,c4$) bestätigt aber die gefundene Proportionalität die – zumindest bezüglich des AICD bestehende – *Austauschbarkeit* der Formen NFATc2 und NFATc3 untereinander. Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass für alleinige NFATc3-Defizienz (bei normalem NFATc2-Gehalt)

⁵Nach neuesten Daten kommt NFATc1 in speziellen B-Zellen (humane DT40-Zellen) eine *anti*-apoptotische Wirkung zu [21].

das Apoptoseverhalten nach CD3-Stimulation unbekannt ist. Bei OUKKA ET AL. in [33] wurde nur der AICD bei unreifen Thymozyten untersucht⁶, nicht jedoch in peripheren T-Helfer-Zellen, so dass die direkte Bestätigung diesbezüglich noch aussteht. Alternativ zum ‘Nebeneinander’ der beiden Faktoren NFATc2 und NFATc3 wäre die Möglichkeit denkbar, dass bei Wildtyp-Zellen nur der Faktor NFATc2 (dominiert in T-Lymphozyten über NFATc3) die Apoptose reguliert, und erst beim Ausfall dieses Typs (künstlich in NFATc2-Knock-out-Tieren) der Faktor NFATc3 ‘einspringt’ und – entsprechend seiner mengenmäßigen Verteilung – eine Restfunktion in der Apoptoseregulation aufrecht erhält. Unter dieser Annahme müssten sich die Apoptoseraten der untersuchten Zelltypen (Knock-out-Grad 0 - 1 - 1^{1/2} - 2) nicht – wie in Abbildung 3.6 angegeben – wie 100 : 43 : 22 : 0⁷, sondern wie 100 : 77 : 38 : 0⁸ verhalten. Letzteres stimmt aber mit den gemessenen Werten (siehe ebenfalls Abb. 3.6) *nicht* überein, so dass wohl doch die **additive Wirkung von NFATc2 + NFATc3** zur Entfaltung kommt.

Bei RANGER ET AL. wird in [37] bezüglich der Aktivierbarkeit über den T-Zell-Rezeptor ein Schwellenwert-Modell für T-Zellen angenommen. Demnach erhöhen NFATc2 und NFATc3 diese Schwelle (Vermeidung von Hyperproliferation), wohingegen NFATc1 die Schwelle erniedrigt (Vermeidung von Hypoproliferation). Aus der Tatsache, dass NFATc2/c3-doppelt-knock-out-Mäuse einen deutlich veränderten Phänotyp zeigen (Hyperproliferation bzw. mangelnde Apoptose und Hyperaktivierung), die jeweiligen Einzelknock-out-Tiere dagegen nicht [37], schließen die Autoren, dass ein diskreter Schwellenwert existieren muss, der die beiden Phänotypen (Hyperproliferation ↔ normal) voneinander trennt. Berücksichtigt man die in dieser Arbeit aufgezeigte Proportionalität, so kann die postulierte Schwelle *nicht* von Seiten des NFAT-Gehaltes bzgl. der Formen c2 und c3 herrühren, da bezüglich der Apoptose **keine Schwelle**, sondern nur ein ‘mehr oder weniger’ existiert. Ein Gegenspieler-System aber, das sich seinerseits insgesamt auf einem definierten ‘Level’ befindet, kann – je nach Höhe dieses Levels – das oben beschriebene Szenario bezüglich des Phänotyps ermöglichen. Liegt also das ‘Gegenspieler-Level’ entsprechend niedrig, dass bereits *einer* der Faktoren NFATc2 *oder* NFATc3 ausreicht, um die Wirkung der Gegenspieler (z.B. entsprechende Isoformen des NFATc1) zu kompensieren, so führt erst der gleichzeitige Mangel *beider* Formen zum Ungleichgewicht

⁶Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 dargelegt, zeigte sich dabei eine *vermehrte* Apoptoserate.

⁷entsprechend der NFAT-Mengen: $c2+c3 - c3 - 1/2 c3 - 0$

⁸entsprechend der NFAT-Mengen: $c2 - c3 - 1/2 c3 - 0$

und damit zur Eskalation des Phänotyps. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Gleichgewichtsniveau *nicht* auf einer Höhe liegen kann, die die Wirkung *beider* Formen gleichzeitig nötig macht. Vielmehr besteht eine Sicherheitsreserve mit der Möglichkeit der gegenseitigen Vertretung. Allerdings muss unter Berücksichtigung der vorherigen Ausführungen davon ausgegangen werden, dass prinzipiell *beide* Formen gleichzeitig aktiv sind und evtl. nur das Überwiegen des Gegenspielers (unabhängig davon um wieviel – also rein qualitativ, nicht quantitativ) den Normalzustand ausmacht.

4.3.2 Das Geflecht der Signalwege

Bei SCHUH ET AL. in [44] wurde bei NFATc2-defizienten T-Zellen eine *unbeeinträchtigte* Apoptose nach Stimulation mit α Fas festgestellt, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Allerdings wurde ohne Demonstration der Daten konstatiert, dass bei NFAT-defizienten Lymphozyten die Expression des **FasL** mit der von Wildtyp-Zellen *vergleichbar* sei (wohl bei naiven Zellen ohne Apoptoseinduktion, Angaben dazu fehlen). Bei HODGE ET AL. wurden in [12] ebenfalls NFATc2-defiziente Mäuse untersucht. Nach in-vivo-Simulation mit α CD3 zeigte sich bei der ‘Northern-Blot’-Analyse der RNA (aus Milzzellen) eine deutliche FasL-Reduktion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen.⁹ Unter Berücksichtigung der unbestrittenen Reduktion des AICD bei NFATc2-defizienten T-Zellen und des vermuteten Signalweges über den FasL-Promotor [25, 53] muss davon ausgegangen werden, dass auch bei den ‘Knock-out’-Zellen in [44] *nach Apoptoseinduktion* ein Unterschied bzgl. der FasL-Expression im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen vorhanden ist.

VAN PARIJS ET AL. konnten in [57] zeigen, dass zur CD3-vermittelten Hochregulation von FasL das Vorhandensein des Faktors **Stat5** notwendig ist, um den vollen Umfang des AICD zu erhalten.

RENGARAJAN ET AL. beschreiben in [39] die NFATc2/c3-Abhängigkeit der Transkriptionsfaktoren Egr2 und Egr3,¹⁰ die ihrerseits als potente Aktivatoren der FasL-Expression bekannt sind [28, 29]. Zum einen wird dort durch Untersuchungen an NFATc2^{-/-}-, NFATc3^{-/-}-Einfach- und NFATc2^{-/-}c3^{-/-}-Doppelt-k.o.-Mäusen festgestellt, dass nur NFATc2 *oder* NFATc3 zur Expression der Egr-Faktoren 2 und 3 notwendig ist. In Trans-

⁹Ohne CD3-Stimulation zeigte sich *keine* nachweisbare Menge von FasL. Die gefundene Menge an *Fas* war praktisch unabhängig vom Zelltyp und von der CD3-Stimulation.

¹⁰‘Egr’ steht für “early growth response”.

fektionsexperimenten mit NFATc2^{-/-}c3^{-/-}-k.o.-Zellen konnte mittels des Luciferase-Reportergens und entsprechenden Kotransfektionen weiter gezeigt werden, dass der FasL-Promotor sowohl durch NFATc2 allein, als auch durch **Egr3** allein transaktiviert werden kann.

SYTWU ET AL. konnten in [54] bei Fas-defizienten (lpr^{+/+}) Tieren nach in-vivo-Stimulation des transgenen T-Zell-Rezeptors *keinen* Unterschied bezüglich des AICD bei reifen CD4⁺-T-Zellen gegenüber Fas-tragenden Vergleichszellen erkennen. Daraus folgern die Autoren die Existenz eines **Fas-unabhängigen Signalweges** zur Auslösung des AICD. RUSSELL ET AL. hingegen beschreiben für denselben Fas-defizienten Zelltyp in [41] gerade *doch* einen Defekt im AICD, wobei hier explizit eine Induktion mit α CD3 vorgenommen wurde. Eine Klärung dieser Frage könnte evtl. durch den Einsatz von blockierenden Antikörpern gegen FasL oder Fas gelingen.

So oder so ist erkennbar, dass es sich bei der Auslösung des AICD weniger um einen einzelnen Signalweg im Sinne einer kettenförmigen Abfolge, als vielmehr um ein *Geflecht* aus vielen verschiedenen Signalkaskaden (siehe Abbildung 4.2) handelt, das sich – bei unserem derzeit noch unvollständigen Wissen darüber – gleichsam als Irrgarten (siehe z.B. die widersprüchlichen Ergebnisse im letzten Absatz) darstellt, für den wir den berühmten “Roten Faden” noch finden müssen.

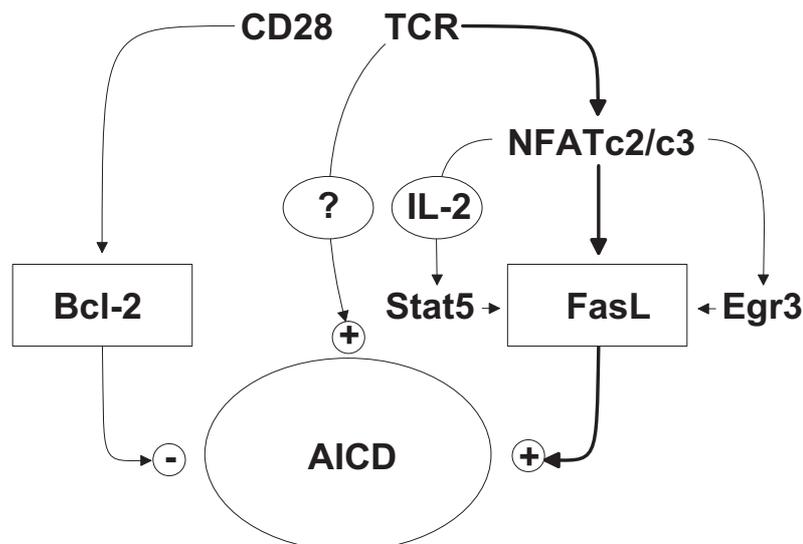


Abbildung 4.2: Überblick über einen kleinen, im Text beschriebenen Ausschnitt aus dem Geflecht der Signalwege zur Regulation des AICD in T-Helfer-Zellen. Der wahrscheinliche Hauptweg des AICD ist dabei ‘fett’ markiert.

4.4 Ausblick

Es liegt also noch viel Forschungsarbeit vor uns, viele Wege in dem im letzten Abschnitt beschriebenen ‘Irrgarten’ gilt es noch zu erkunden, und je weiter wir vordringen, desto mehr Verzweigungen entdecken wir.

So führt z.B. die Charakterisierung unterschiedlicher NFAT-Isoformen unweigerlich zur Frage, wie diese sich denn jeweils bezüglich des AICD verhalten. Dass dabei keine einheitliche Antwort zu erwarten ist, zeigen bereits erste Ergebnisse in [5].

Es wurde ebenfalls erwähnt, dass eine Ausweitung des Gültigkeitsbereiches gemachter Aussagen nicht unkritisch vorgenommen werden darf. Thymozyten und reife T-Zellen verhalten sich, wie erwähnt, nicht zwangsläufig gleich. Es könnte sich als spannend und lohnend herausstellen, den Grund für die unterschiedliche Reaktionsweise herauszuarbeiten.

Wie wir aus Betrachtungen in der Physik (Quantenmechanik) wissen, wird *jedes* System durch eine Messung an ihm unweigerlich *verändert*. Messen ist nicht nur beobachten, messen heißt eingreifen. Allein schon aus diesem Grund ist es dringend erforderlich, alle gemachten Aussagen auch aus anderen Blickwinkeln zu überprüfen und sich neue Messanordnungen zu überlegen. Der NFAT-Einfluss auf eine Zelle kann durch Gen-knock-out verändert werden, oder durch Überexpression mittels Retroviren, oder durch Transfektion von Plasmiden, oder durch blockierende Antikörper auf unterschiedlichen Ebenen, oder durch direkte Zugabe von außen, oder... . Jede Methode liefert einen neuen Blickwinkel und hilft uns so, die Landkarte unseres Wissens zu vervollständigen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Der ‘Activation Induced Cell Death’ (AICD) stellt eine Sonderform der Apoptose dar, deren reibungsloses Funktionieren nicht nur für den gezielten *Untergang* einer einzelnen Zelle verantwortlich ist, sondern auch dadurch für das *Überleben* des Gesamtorganismus unabdingbar wird.¹

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der NFAT-Transkriptionsfaktoren, genauer die der Formen NFATc2 und NFATc3, beim AICD von peripheren T-Lymphozyten untersucht. Dazu wurde besonders die Auslösbarkeit der Apoptose mittels α CD3-Antikörpern bei Wildtyp- bzw. ‘Knock-out’-Mäusen mit folgender NFAT-Ausstattung verglichen: NFATc2^{+/+}c3^{+/+}, NFATc2^{-/-}c3^{+/+}, NFATc2^{-/-}c3^{-/+}, NFATc2^{-/-}c3^{-/-}.

In zwei unabhängigen Experimenten wurden aus den Lymphknoten dieser Tiere CD4⁺-T-Helfer-Zellen isoliert und mit α CD28, α CD3 und IL-2 kompetent für drei Tage stimuliert. Nach vier weiteren Tagen der Expansion nur unter Anwesenheit von IL-2 wurde schließlich mittels α CD3 bzw. α Fas die Apoptose induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels FACS-Analyse nach Färbung mit Annexin-V gemessen.

Dabei zeigte sich, dass die CD3-vermittelte Apoptose – im Gegensatz zur Fas-vermittelten – mit dem Gesamtgehalt der Zelle an NFATc2 und NFATc3 korreliert und diesbezüglich eine *direkte Proportionalität* angenommen werden kann.

Neben spezifischen Aspekten der durchgeführten Experimente wurden auch prinzipielle Überlegungen zur Methodik diskutiert und das Ergebnis in das aus der Literatur bekannte Gesamtbild des AICD eingeordnet.

¹Im Wechselspiel zwischen Zelle und zugehörigem Gesamtorganismus bewahrheitet sich so der Bibelvers: “Wer an seinem Leben hängt verliert es; wer aber sein Leben in dieser Welt geringachtet, wird es bewahren ...” [2]

Anhang A

Ergänzungen

A.1 Details der (In-)Aktivierung von T-Helfer-Zellen

Das Schlüsselereignis der **Aktivierung** einer reifen T-Helfer-Zelle [13, 15], die definitionsgemäß CD4-positiv ist, stellt die Bindung einer Antigensequenz¹ dar, die der T-Helfer-Zelle über ein MHC-II-Molekül präsentiert werden muss. Das linearisierte Antigenbruchstück stammt dabei aus dem Phagozytoseinhalt einer professionellen Antigenpräsentierenden Zelle (APC), also einer dendritischen Zelle, eines Makrophagen oder einer B-Zelle (alle anderen Zellen enthalten in der Regel nur MHC-I-Moleküle). Da der T-Zell-Rezeptor (TCR) keinen ausreichenden zytoplasmatischen Anteil besitzt, ist dieser stets mit einem CD3-Komplex vergesellschaftet, der die Signalweiterleitung ins Innere der Zelle übernimmt. Letzterer wird dabei durch *extrazelluläre* Wechselwirkung mit dem T-Zell-Rezeptor aktiviert. Unterstützt wird diese Antigenerkennung durch zusätzliche, unspezifische Bindung des MHC-II-Moleküls über den CD4-Komplex, der das TCR-Signal im Sinne eines Ko-Rezeptors um das 100-fache verstärkt. Dann reichen ca. 100 spezifische Peptid-MHC-Komplexe einer APC aus (ca. 0,1 % der MHC-II-Moleküle einer solchen Zelle), um eine T-Zelle zu aktivieren [13].² Zusätzlich zu der gerade beschriebenen *spezifischen* Wechselwirkung (TCR + Korezeptor CD4) ist für die kompetente, zu Proliferation und Differentiation führende Aktivierung der reifen, naiven T-Helfer-Zelle ein *zweites*, kostimulatorisches Signal notwendig. Dazu muss *dieselbe* APC eine weitere

¹Entscheidend ist die Aminosäuresequenz (Länge meist 10-12 Aminosäuren [15]), die Faltung des Peptids ist dabei aufgehoben.

²Für die Aktivierung scheint auch das Vorhandensein der Thyrosinphosphatase CD45 auf der Oberfläche der T-Helfer-Zelle nötig zu sein [30].

Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung mit der T-Zelle eingehen. Am besten charakterisiert ist dabei die Interaktion zwischen sog. B7-Molekülen³ der APC mit CD28 der T-Helfer-Zelle. Das Fehlen einer solchen Kostimulation führt zur Anergie oder gar Apoptose der T-Zelle.

Die Weiterleitung des Aktivierungssignals ins Innere der Zelle geschieht über die Tyrosinkinase Lck⁴ und Fyn⁵ durch Rekrutierung und Aktivierung von ZAP70⁶. An dieser Stelle spaltet sich der Signalweg in mindestens drei Linien auf:

Zum einen führt die Aktivierung des GTP-bindenden Ras-Proteins über eine Mehrschritt-Kaskade mit Expression, Aktivierung und schließlich Zusammenlagerung der Proteine Fos und Jun zur Bildung des Transkriptionsfaktors **AP-1**.

Zum anderen führt die Aktivierung der Phospholipase C- γ durch ZAP70 mittels Spaltung des in der Zellmembran enthaltenen Phosphatidylinositolbisphosphats (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) zu den weiteren zwei erwähnten Signalwegen.

IP₃ bewirkt über ligandengesteuerte Ca²⁺-Kanäle einen Anstieg der Ca²⁺-Konzentration im Zytosol und aktiviert, zusammen mit Calmodulin, so die zytosolische Proteinphosphatase Calcineurin. Dadurch kommt es zur Dephosphorylierung von **NFAT**-Proteinen, was deren Translokation in den Zellkern ermöglicht, wo sie ihre Wirkung als Transkriptionsfaktoren entfalten können.

Der dritte Signalweg schließlich, der durch DAG in Gang gesetzt werden kann, führt über die Aktivierung der Proteinkinase C und der Bildung des IKK-Komplexes (I κ B-Kinase-Komplex) zur Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B.

Die Zusammenwirkung dieser Transkriptionsfaktoren, d.h. von AP-1, NFAT und NF- κ B, führt zur Expression eines spezifischen Genmusters und damit zur Aktivierung der T-Zelle. Entscheidend dabei ist die Bildung von Interleukinen, insbesondere von IL-2, IL-4 und IL-12, die autokrin und parakrin zur Proliferation und Differentiation führen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass durch NFAT-Aktivierung auch die Expression des Fas-Liganden (FasL) induziert wird [25]. Bevor auf die Konsequenz dieser

³Es handelt sich um zwei strukturverwandte Glykoproteine B7.1 und B7.2, deren funktionelle Unterschiede noch nicht geklärt sind [13].

⁴Lck ist mit dem CD4-Molekül assoziiert [13].

⁵Fyn stammt aus dem Zytoplasma und lagert sich an Untereinheiten von CD3 an [13].

⁶Das 'Zeta(ζ)-assoziierte Protein 70' (ZAP70) stammt aus dem Zytosol. Nach Phosphorylierung der Untereinheiten von CD3 (u.a. CD3 ζ) durch Lck und Fyn erfolgt die Bindung von ZAP70 an CD3 mit anschließender Aktivierung ebenfalls durch Lck und Fyn [13].

Tatsache für das Überleben bzw. den Untergang aktivierter T-Zellen eingegangen werden kann, sollte zunächst die Rolle der Kostimulation (B7 – CD28) erörtert werden.

Die wichtigste Wirkung des kostimulierenden Signals stellt die Verstärkung der IL-2-Synthese der T-Zelle dar. Entscheidend dabei ist, dass die Bindung von B7 an CD28 zur Stabilisierung der IL-2-mRNA führt. Neben dieser Steigerung der Translation (ca. x 20-30) der mRNA kommt es durch zusätzliche Aktivierung von AP-1 und NF- κ B auch zur verstärkten Transkription (ca. x 3) des IL-2-Gens und damit insgesamt zu einer 100fachen Steigerung der IL-2-Produktion [13]. Das kostimulatorische Signal beeinflusst zwar nicht die durch die T-Zell-Aktivierung initiierte FasL-Expression [30], führt aber durch Bildung des apoptosehemmenden Faktors Bcl-x_L⁷ [31] zu einem (evtl. nur transienten [56]) Schutz vor dem AICD.

Über die Mechanismen der **Inaktivierung**⁸ von T-Zellen besitzen wir bisher nur bruchstückhaftes oder spekulatives Wissen. Bekannt ist, dass T-Helfer-Zellen nach ihrer Aktivierung in Alternative zu CD28 einen weiteren Rezeptor, nämlich CTLA-4 exprimieren, der eine 20fach höhere Affinität für B7 besitzt als CD28. Eine Bindung über CTLA-4 sendet der aktivierten T-Zelle ein negatives Signal und führt u.a. zur Limitierung der IL-2-Produktion [13]. Damit spielt CTLA-4 eine wesentliche Rolle bei der Begrenzung der Immunantwort. Aber auch über die IL-2-Produktion selbst scheint ein *negativer* Feedback-Mechanismus zu existieren. IL-2, das als Wachstumssignal wirkt, hat eine weitere entscheidende Wirkung auf T-Helfer-Zellen: Es sensibilisiert die T-Zelle für die Fas-vermittelte Apoptose. Es gibt Hinweise darauf [55, 57], dass dabei die Dosierung von IL-2 eine Rolle bei der Wirkung in Richtung Aktivierung (niedrige Dosierung führt evtl. zur Bcl-2-Aktivierung [57]) oder Apoptose (hohe Dosierung führt evtl. über Stat5-Transkriptionsfaktoren zur gesteigerten Expression von FasL [57]) spielt. Andere Autoren [26] gehen von einer Signifikanz der zeitlichen Reihenfolge von IL-2-Exposition und TCR-Aktivierung aus. Demnach führe IL-2-Exposition *nach* TCR-Bindung (z.B. durch die endogene, mittels TCR-Signal ausgelöste IL-2-Produktion) zur Proliferation, wohingegen die IL-2-Exposition *vor* TCR-Bindung (z.B. durch repetitive T-Zell-Stimulierung) Apoptose auslöse. So oder so ist davon auszugehen, dass eine repetitive oder langdauernde TCR-Stimulation letztlich auch über IL-2-Wirkung zum AICD führt, und dass

⁷Bcl-x_L gehört zur Bcl-2-Familie, welche Apoptose inhibiert [11].

⁸z.B. im Rahmen der Beendigung der Immunreaktion, der peripheren T-Zell-Toleranz oder evtl. auch der negativen Selektion (noch *unreife* T-Zellen).

dabei der Mechanismus der Apoptoseinduktion über den Fas-Rezeptor nach Bindung des Fas-Liganden ausgenutzt wird. Dass hierbei neben dem Rezeptor Fas auch der auslösende Fas-Ligand von der Zielzelle selbst exprimiert wird, unterstreicht die Sonderrolle des AICD als Form der Apoptose. Der weitere Ablauf der Apoptose wurde bereits in der Einleitung (siehe Abschnitt 1.1 und Abb. 1.2) ausführlich geschildert.

A.2 Vergleichbarkeit trotz unterschiedlicher Spontanraten

Bei den beiden in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten A und B ergaben sich – wie bereits mehrfach erwähnt – unterschiedliche *spontane* Apoptoseraten (d.h. *ohne* spezifische Induktion), was einen direkten Vergleich der Messergebnisse zunächst nicht zulässt. In diesem Abschnitt sollen nun Überlegungen dargelegt werden, wie die Apoptoseraten nach Induktion ermittelt werden können, die um die jeweils unterschiedliche *spontane* Apoptoserate ‘bereinigt’ sind. Diese korrigierten Werte können dann quantitativ zwischen den Experimenten A und B (siehe 3.2.1) verglichen werden.

Entstehung der spontanen Apoptoserate: Ungenügende Wachstumsbedingungen (z.B. ein relativer Mangel an Wachstumsfaktoren) führen unter anderem, wie in Abschnitt 1.1.1 dargelegt, zur Apoptose und münden ‘*unterhalb*’ des NFAT-abhängigen Abschnitts in die Signal-Kaskade⁹ ein, die schließlich zum Zelluntergang führt.

Unabhängigkeit zwischen spontaner und induzierter Apoptoserate: Bei Zugabe der Antikörper (α CD3 bzw. α Fas) zur Induktion der Apoptose ist anzunehmen, dass diese ihre Zielstruktur (CD3-Komplex bzw. Fas-Rezeptor) *unabhängig* davon binden, ob die zugehörige Zelle ruht, oder ob sie sich gerade in spontaner Apoptose befindet. Auch sollte die apoptotische Signalkaskade an ihrem Anfang angestoßen werden können, *unabhängig* davon, ob sie bereits weiter ‘unterhalb’ (spontan) im Gange ist. Die Hypothese ist daher, dass sich die Zellen in folgende vier Populationen aufspalten (siehe Abb. A.1):

- apoptotische Zellen,
 - die sich in *spontaner* Apoptose befinden *und* zusätzlich *induziert* wurden (‘A’)
 - die sich in *spontaner* Apoptose befinden aber *nicht* induziert wurden (‘B’)
 - bei denen Apoptose aus Ruhe heraus *induziert* wurde (‘C’)
- vitale Zellen (‘D’)

⁹Pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie werden u.a. an der Mitochondrienmembran lokalisiert, setzen Cytochrom c frei und stoßen so die proteolytische Kaskade an [6].

Warum die überlebenden Zellen ('D') refraktär bezüglich einer Apoptoseinduktion sind, sei in diesem Zusammenhang dahingestellt.¹⁰ Wichtig ist zunächst nur, dass die nach Induktion *gemessene* Anzahl an apoptotischen Zellen (grauer Flächenanteil in Abb. A.1) sich aus den zwei Untergruppen 'spontane' (///// in Abb. A.1) und 'induzierte' (\\\\\\ in Abb. A.1) Apoptose zusammensetzt, wobei diese jedoch teilweise *überlappen* (doppelt schraffierte Fläche A in Abb. A.1).

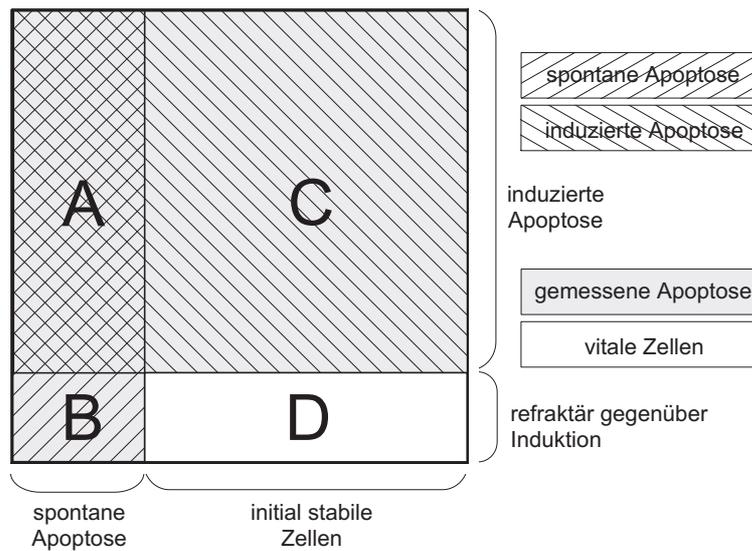


Abbildung A.1: Mengendiagramm (Fläche entspricht Zellzahl) zur Erläuterung des Zusammenhangs zwischen gemessener Apoptose und den beiden Formen 'spontaner' und 'induzierter' Apoptose unter der Annahme der Unabhängigkeit dieser Apoptoseformen. Die Gesamtzahl der Zellen zerfällt in folgende Untergruppen: spontan apoptotische Zellen, die zusätzlich induziert wurden (A); spontan apoptotische Zellen, die refraktär gegenüber der Induktion sind (B); initial stabile Zellen, die dann induziert wurden (C); stabile Zellen, die refraktär gegenüber der Induktion sind (D). Die beiden schraffierten Flächen (spontane bzw. induzierte Apoptose) überlappen dabei um den Bereich A (doppelt schraffiert). Der graue Flächenanteil (A+B+C) entspricht dabei der *gemessenen* Anzahl apoptotischer Zellen.

Berechnung der bereinigten Apoptoserate: An Hand des Gesagten und der Abbildung A.1 lassen sich folgende Überlegungen anstellen:

$$\begin{aligned}
 \text{gemessen wird:} \quad & \text{ohne Induktion} \rightarrow A+B & =: \text{Apoptoserate}_{\text{spontan}} \\
 & \text{mit Induktion} \rightarrow A+B+C & =: \text{Apoptoserate}_{\text{induziert}} \\
 \\
 \text{wissenswert ist:} \quad & \text{ohne Induktion} \rightarrow A+B & =: \text{Apoptoserate}_{\text{spontan}} \\
 & \text{mit Induktion} \rightarrow A+ C & =: \text{Apoptoserate}_{\text{bereinigt}}
 \end{aligned}$$

¹⁰Berücksichtigt man in einem komplexeren Modell Bindungs- und Auslösewahrscheinlichkeit der induzierenden Antikörper getrennt, so stellt das hier dargelegte Modell den Sonderfall mit vollständiger Bindung dar.

Einfache geometrische Überlegungen mit Blick auf Abb. A.1 führen zu folgendem Ansatz:

$$A : B = C : D = (A + C) : (B + D) \quad \text{und}$$

$$A + B + C + D = 100 \%$$

Mit Hilfe einfacher mathematischer Überlegungen lässt sich daraus die ‘bereinigte Apoptoserate’ (in %) aus den gemessenen Größen Apoptoserate_{spontan} (in %, ohne Induktion) und Apoptoserate_{induziert} (in %, nach Induktion) über folgende Formel berechnen:

$$\text{Apoptoserate}_{\text{bereinigt}} = \frac{\text{Apoptoserate}_{\text{induziert}} - \text{Apoptoserate}_{\text{spontan}}}{100 - \text{Apoptoserate}_{\text{spontan}}} \cdot 100 [\%]$$

Dabei ist die Vorstellung – wie oben dargelegt – die, dass die ‘bereinigte’ Apoptoserate die ‘wahre’ Apoptoserate nach Induktion darstellt (\\\ schraffierte Fläche statt der ‘gemessenen’ grauen Fläche in Abb. A.1), die *alleinig* auf die Induktion zurückzuführen ist und *nicht* mehr durch die spontane Apoptoserate verfälscht wird.

A.3 Abschätzung des relativen NFAT-Gehaltes der Zellen

Wie bereits in Abschnitt 3.3.2 dargelegt, ist eine quantitative Bestimmung der Menge an unterschiedlichen NFAT-Faktoren (hier NFATc2 und NFATc3) – wenn auch nur relativ zueinander – nicht nur praktisch, sondern bereits *prinzipiell* schwierig [49]. Zum einen ist der (relative) Gehalt neben der Zellart in erster Linie vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig, zum anderen sind die zur Erkennung und damit Bestimmung notwendigen Antikörper (auf Proteinebene) bzw. Primer (auf mRNA-Ebene) naturgemäß von einander verschieden und daher zwangsläufig von unterschiedlicher Affinität zu ihrer jeweiligen Zielstruktur. Der Versuch, den relativen NFAT-Gehalt (NFATc2 : NFATc3) trotz dieser Einschränkungen abzuschätzen, darf daher nicht überbewertet werden und ist nur als grober Anhaltspunkt zu verstehen.

Aus der Veröffentlichung von RANGER ET AL. [37, Abb. 1] kann der Abdruck eines Northern-Blots entnommen werden, in dem unter anderem der Gehalt von NFATc1, NFATc2 und NFATc3 aus ruhenden, wildtypischen T-Helfer-Zellen auf RNA-Ebene dargestellt ist.

Für diese Arbeit wurde nun eine photometrische Analyse dieser Abbildung vorgenommen, um den relativen Gehalt NFATc2 : NFATc3 zu bestimmen. Zuerst wurde dazu der

veröffentlichte Schwarz-Weiß-Abdruck des angegebenen **Blots** mittels Scanner¹¹ **digitalisiert** und in den Computer eingelesen. Zur Quantifizierung der dargestellten **Grauwerte** – die ja die jeweilige NFAT-Menge repräsentieren – wurden aus den veröffentlichten Banden jeweils identisch große Ausschnitte ausgewählt und zunächst mit dem Programm “WinDIG 2.5”¹² ausgewertet. Dabei wurden durch dieses Programm die Grauwerte der einzelnen Bildpunkte **spaltenweise aufsummiert**. Diese Daten wurden dann in eine Tabellenkalkulation übertragen, dort aufaddiert und schließlich der **Mittelwert** über die gesamte, ausgewählte Fläche gebildet.

Um nun diesem Mittelwert einen prozentualen Grauwert zwischen 100 % (schwarz) und 0 % (weiß) zuzuordnen, wurde eine **Eichtabelle** mit 11 verschiedenen, definierten Grauwerten ausgedruckt und dem selben, oben für den Blot dargestellten Verfahren unterworfen. So konnte für NFATc2 und NFATc3 jeweils für T-Helfer-Zellen vom Typ 1 und vom Typ 2 Mengenangaben relativ zueinander gewonnen werden, wobei wiederum ein Mittelwert über die T-Helfer-Zell-Subtypen 1 und 2 gebildet wurde. Zusätzlich ergab sich aus dem Eichvorgang eine Schätzung für die Genauigkeit des Verfahrens (jeweils ± 6 %-Punkte). Damit konnten folgende Werte gefunden werden:

NFAT	c2	c3
relativer Gehalt	90 % \pm 4 %	69 % \pm 4 %

Die angegebenen Standardfehler ergeben sich dabei aus der geschätzten Genauigkeit des Verfahrens (s.o.) und der Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes [35].

Mit diesem Verhältnis von NFAT c2 : c3 = 90 : 69 lässt sich der relative NFAT-Gehalt der T-Zellen näherungsweise wie folgt angeben:

Zelltyp:	NFAT	c2 ^{+/+} c3 ^{+/+}	c2 ^{-/-} c3 ^{+/+}	c2 ^{-/-} c3 ^{-/+}	c2 ^{-/-} c3 ^{-/-}
NFAT-Gehalt (c2+c3)		(90 + 69) %	69 %	$\frac{1}{2} \cdot 69$ %	0 %
NFAT-Gehalt normiert		100 %	43 % \pm 5 %	22 % \pm 4 %	0 %

Dabei wurde in der letzten Zeile dieser Tabelle eine Normierung für den Gesamtgehalt der T-Zelle an NFATc2 + NFATc3 zu 100 % vorgenommen. Die angegebenen Standardfehler berücksichtigen mittels Fehlerrechnung sowohl die Umformungen, um den NFAT-Gehalt des jeweiligen Zelltyps anzugeben, als auch die durchgeführte Normierung. Die Werte dieser Tabellenzeile wurden in Abschnitt 3.3.2 angegeben und verwendet.

¹¹Epson Perfection 1240U mit 300 dpi

¹²‘Freeware’ aus dem Internet

gehalt an NFATc2 + NFATc3. Am rechten Rand (in grün) sind noch die Mittelwerte über die verschiedenen Messzeiten aufgetragen, wie sie in Abb. 3.6 verwendet wurden (inkl. der zugehörigen Standardfehler).

Genauigkeitsabschätzung einer Einzelmessung: Als Abschätzung der Standardabweichung [40] (Schwankungsbreite einer *Einzelmessung*) können die Ergebnisse der Wildtyp-Experimente herangezogen werden.

Es kann eine Abschätzung einer *intra*-individuellen Schwankung angegeben werden (zwischen spontanen Werten und nach Stimulation mit dem inerten α Ham-Antikörper), dabei ergibt sich ein Standardfehler von $\sigma = \pm 5\%$ (als nachträglicher Mittelwert über die beide Wildtyptiere in Experiment A).

Eine Abschätzung der *inter*-individuelle Schwankungsbreite ergibt sich aus dem Vergleich der Messwerte der beiden Wildtyptiere untereinander zu $\sigma = \pm 4\%$ (als nachträglicher Mittelwert über die beide Stimulationsarten ‘spontan’ und ‘ α Ham’).

Es bietet sich an, das Maximum dieser beiden Werte für die Abschätzung des Standardfehlers einer Einzelmessung zu nehmen. Daher ergibt sich der folgende Wert:

$$\sigma_{\text{Einzelmessung}} = \pm 5\%$$

Fehlerrechnung für die ‘Bereinigung’ der spontanen Apoptoserate: Zur Vereinfachung der Schreibweise wird die Formel von Seite 52 mit folgenden Abkürzungen geschrieben: $x_s = \text{Apoptoserate}_{\text{spontan}}$, $x_i = \text{Apoptoserate}_{\text{induziert}}$, $f(x_s, x_i) = \text{Apoptoserate}_{\text{bereinigt}}$. Es ergibt sich also:

$$f(x_s, x_i) = 100 \cdot \frac{x_i - x_s}{100 - x_s} \quad \wedge \quad \sigma_{x_s} = \sigma_{x_i} =: \sigma_x = 5\%$$

Mit Hilfe des Fehlerfortpflanzungsgesetzes [35] ergibt sich über die partiellen Ableitungen von f die folgende Formel für die Varianz $\sigma_b^2 = \sigma_{\text{bereinigt}}^2$ der bereinigten Werte:

$$\begin{aligned} \sigma_b^2 &= \left(\frac{\partial f(x_s, x_i)}{\partial x_s} \right)^2 \cdot \sigma_{x_s}^2 + \left(\frac{\partial f(x_s, x_i)}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \sigma_{x_i}^2 \\ &= \sigma_x^2 \cdot \left(\frac{100}{100 - x_s} \right)^2 \cdot \left(1 + \frac{(100 - x_i)^2}{(100 - x_s)^2} \right) \end{aligned}$$

Fehlerrechnung für die Normierung der ‘bereinigten’ Werte: Die ‘bereinigten’ Apoptoseraten der Wildtyptiere (x_{wt}) sollen hierbei als Referenzwert (100%) dienen. Die entsprechenden Werte der verschiedenen Knock-out-Tiere (x_{ko}) sollen dabei nach

folgender Formel umgerechnet werden:

$$\text{Apoptoserate}_{\text{normiert}} = g(x_{ko}, x_{wt}) = 100 \cdot \frac{x_{ko}}{x_{wt}} \quad \wedge \quad \sigma_{x_{wt}}^2 = \sigma_b^2(wt) \quad \wedge \quad \sigma_{x_{ko}}^2 = \sigma_b^2(ko)$$

Für die Varianz dieser normierten Werte ergibt sich wieder über das Fehlerfortpflanzungsgesetz folgender Ausdruck:

$$\begin{aligned} \sigma_{\text{normiert}}^2 &= \left(\frac{\partial g(x_{ko}, x_{wt})}{\partial x_{ko}} \right)^2 \cdot \sigma_{x_{ko}}^2 + \left(\frac{\partial g(x_{ko}, x_{wt})}{\partial x_{wt}} \right)^2 \cdot \sigma_{x_{wt}}^2 \\ &= \left(\frac{100}{x_{wt}} \right)^2 \cdot \left(\sigma_{x_{ko}}^2 + \sigma_{x_{wt}}^2 \left(\frac{x_{ko}}{x_{wt}} \right)^2 \right) \end{aligned}$$

Fehlerrechnung für Mittelung über die Messzeitpunkte: Schließlich bleibt noch die Mittelwertbildung (MW) aus den normierten Werten über die verschiedenen Messzeitpunkte zu berücksichtigen, die zum Vergleich mit dem NFAT-Gehalt der T-Zellen vorgenommen wurde. Die Anzahl der dazu herangezogenen Messwerte (x_j) soll dabei mit n bezeichnet werden ($n = 4$ oder 3 oder 2 ; der Laufindex j geht also von 1 bis n).

$$\text{Apoptoserate}_{\text{MW}} = h(x_j) = \frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n x_j \quad \wedge \quad \sigma_{x_j}^2 = \sigma_{\text{normiert}}^2 (\text{zum 'Zeitpunkt' } j)$$

Die Varianz dieser Mittelwerte berechnet sich nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz zu:

$$\begin{aligned} \sigma_{\text{MW}}^2 &= \sum_{j=1}^n \left(\frac{\partial h(x_j)}{\partial x_j} \right)^2 \cdot \sigma_{x_j}^2 \\ &= \left(\frac{1}{n} \right)^2 \cdot \sum_{j=1}^n \sigma_{x_j}^2 \end{aligned}$$

Berechnung des Standardfehlers aus der Varianz: Aus der angegebenen Varianz σ^2 lässt sich die Standardabweichung σ ('Genauigkeit' der Einzelmessung) durch Bildung der Quadratwurzel ermitteln. Der Standardfehler $\bar{\sigma}$ ('Genauigkeit' des Mittelwertes) ergibt sich hier aus der Standardabweichung mittels Division durch \sqrt{n} :

$$\bar{\sigma}_{\text{MW}} = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot \sigma_{\text{MW}} = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot \frac{1}{n} \sqrt{\sum_{j=1}^n \sigma_{x_j}^2}$$

Anhang B

Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Gerätschaften

- Autoklav Stiefenhofer
- Brutschränke Nunc, Heraeus
- Eismaschine Genheimer
- FACScan Becton Dickinson
- Gefrierschränke (-20 °C; -70 °C) Privileg, Bosch, Liebherr, Heraeus
- Kühlzentrifugen Heraeus
- Lichtmikroskope Olympus, Leica
- Mikroliter-Pipetten Eppendorf, Brand
- Mikrozentrifugen Eppendorf
- pH-Meter Ingold, Hartenstein
- Pinzetten Hartenstein
- Rotoren (JA-10, JA-14) Beckman
- Schüttelinkubator Hartenstein, New Brunswick
- Sterilbank Heraeus, Gelaire
- Ultrazentrifuge Beckman
- Vortexer Hartenstein
- Waage Precisa 300 MC Sartorius, Hartenstein
- Wasser-Entsalzungsanlage (MilliQ-Plus) Millipore
- Zählkammer (Neubauer improved) Brand

B.1.2 Verbrauchsmaterialien

- 1,5 ml ReaktionsgefäßeSarstedt, Eppendorf
- 2 ml Reaktionsgefäße Eppendorf
- 6-well Gewebekulturplatten Greiner bio-one
- 12-well Gewebekulturplatten Greiner bio-one
- 24-well GewebekulturplattenGreiner bio-one, Falcon
- 15 ml/50 ml PolypropylenröhrchenGreiner bio-one, Nunc
- Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml) Hartenstein
- FACS-RöhrchenHartenstein
- Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml, 500 ml) Greiner bio-one
- Gewebekulturschalen (60 mm, 90 mm)Falcon, Greiner bio-one
- GlaswarenSchott
- PipettenspitzenEppendorf
- Serologische Pipetten Sarstedt
- Skalpellklingen (steril)Hartenstein
- Sterilfilter (0,2 μm / 0,45 μm) Schleicher & Schuell
- Zellsiebe (70 μm) Falcon, Laborbedarf Schubert

B.1.3 Reagenzien

- Annexin-V-FLUOS Boehringer
- β -Mercaptoethanol Carl Roth
- BSA Fraktion V (Rinderserumalbumin) Carl Roth
- Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) Carl Roth
- FCS (Fetales Kälberserum) Gibco BRL
- Hepes; N-(2-OH-Ethyl)Piperazin-N'-(3-Propansulfonsäure) Carl Roth, Gibco BRL
- Interleukin-2, murin (rekombinant aus E.coli) Calbiochem
- Kaliumchlorid (KCl)Sigma-Aldrich
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) Sigma-Aldrich
- Kalziumchlorid (CaCl_2) Carl Roth
- L-Glutamin Gibco BRL

- Magnesiumchlorid (MgCl_2) Carl Roth
- MEM (Non-essential amino acids, 100 x) Gibco BRL
- Mouse CD4 Cell Recovery Column Kit CL111-5 Cedarlane
- Natriumazid (NaN_3) Merck Eurolab
- Natriumchlorid (NaCl) Carl Roth
- Natriumhydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) Merck Eurolab
- Natrium-Pyruvat ($\text{C}_3\text{O}_3\text{H}_3\text{Na}$, 100 mM) Gibco BRL
- Penicillin (10.000 IU/ml) Hoechst
- RPMI 1640 Gibco BRL
- Salzsäure (HCl) Merck Eurolab
- Streptomycinsulfat (10 mg/ml) Hoechst
- Tris (2-Amino-2-(Hydroxylmethyl)-1,3-Propandiol) Carl Roth
- Trypanblau 0,1 % Gibco BRL
- Via-Probe (7-Amino-Actinomycin D = 7-AAD Viability Probe) PharMingen
- X-VIVO 15 BioWhittaker

B.1.4 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Alle Chemikalien wurden in bestmöglichem Reinheitsgrad von den jeweils angegebenen Herstellern bezogen. Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem bzw. deionisiertem (Millipore-Filter) Wasser bereitet und anschließend entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte in der Regel bei Raumtemperatur (RT).

- Tris/HCl-Stammlösung (1,5 M)
 - Tris 181,7 g/l
 - HCl pH-Wert mit 1 M Lösung auf 8,5 eingestellt
- PBS (10 x)
 - NaCl 80 g/l
 - KCl 2 g/l
 - CaCl_2 1 g/l
 - MgCl_2 1 g/l
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 26,8 g/l
 - KH_2PO_4 2,4 g/l
 - HCl pH-Wert mit 1 M Lösung auf 7,4 eingestellt

- PBS (1 x)
 - PBS (10 x) 100 ml/l
- PBS –Ca²⁺ / –Mg²⁺ (10 x)
 - NaCl 80 g/l
 - KCl 2 g/l
 - NaH₂PO₄ · 7 H₂O 26,8 g/l
 - KH₂PO₄ 2,4 g/l
 - HCl pH-Wert mit 1 M Lösung auf 7,4 eingestellt
- PBS –Ca²⁺ / –Mg²⁺ (1 x)
 - PBS –Ca²⁺ / –Mg²⁺ (10 x) 100 ml/l
- Antikörper-Beschichtungspuffer für Gewebekulturgefäße
 - Tris/HCl (pH 8,5) 1,5 M 33,3 ml/l
- Annexin-V-Bindepuffer (pH 7,4)
 - HEPES (pH 7,4) 1 M 10 ml/l
 - NaCl 5 M 28 ml/l
 - KCl 1 M 5 ml/l
 - MgCl₂ 1 M 1 ml/l
 - CaCl₂ 1 M 2,5 ml/l
- FACS-Waschpuffer (pH 7,4)
 - PBS (1 x, pH 7,4) 500 ml
 - BSA Fraktion V 0,5 g
 - FCS 25 ml
 - NaN₃ (10 %) 1 ml
- Nährmedium: ‘komplettes RPMI 1640’
 - RPMI 1640 500 ml
 - FCS 10 %
 - L-Glutamin (200 mM) 5 ml
 - Penicillin 30.000 IU
 - Streptomycinsulfat 30 mg
 - β-Mercaptoethanol (50 mM) 500 µl
- Nährmedium: ‘komplettes X-VIVO 15’
 - X-VIVO 15 500 ml
 - FCS 10 %
 - L-Glutamin (200 mM) 5 ml

– Penicillin	30.000 IU
– Streptomycinsulfat	30 mg
– β -Mercaptoethanol (50 mM)	500 μ l
– Natrium-Pyruvat (100 mM)	5 ml
– Hepes (1 M)	5 ml
– MEM (Non-essential amino acids, 100 x)	5 ml

B.1.5 Antikörper

Es wurden uns gereinigte monoklonale Antikörper gegen murines CD3¹ und CD28 von Frau PROF. DR. A. SCHIMPL (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt, die von den gleichen Klonen stammten, wie die von der Firma PharMingen vertriebenen. Käuflich erworben wurden folgende Antikörper:

- gegen murines CD3¹(145-2C11) aus armenischem Hamster PharMingen
- gegen murines CD28 (37.51) aus syrischem Hamster PharMingen
- gegen murines Fas (CD95, Jo2) aus armenischem Hamster PharMingen
- gegen Armenisches-Hamster-IgG aus Ziege Dianova

B.1.6 Zellen

Primäre CD4-positive T-Zellen wurden aus den Lymphknoten von wildtypischen Balb\c Mäusen oder von Balb\c Mäusen, die defizient für NFATc2 [12, 44] bzw. NFATc2 und NFATc3 (c3^{-/+} bzw. c3^{-/-}) [36] waren, gewonnen (zum praktischen Vorgehen siehe Abschnitt B.2.1).

B.1.7 Hersteller und Vertreiber

- Beckman Palo Alto, CA, USA
- Becton Dickinson San Jose, CA, USA
- BioWhittaker Inc. Verviers, Belgien
- Boehringer Mannheim, Deutschland
- Bosch: Robert Bosch GmbH Stuttgart, Deutschland
- Brand GmbH + Co. KG Wertheim a.M., Deutschland
- Calbiochem-Novabiochem AG Bad Soden, Deutschland

¹genauer: gegen die ϵ -Untereinheit

- Carl Roth GmbH + Co. Karlsruhe, Deutschland
- Cedarlane Hornby, Ontario, Kanada
- Dianova Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Hamburg, Deutschland
- Falcon (BD Biosciences) .. Heidelberg, Deutschland; Boston, Massachusetts, USA
- Gelaire Flow Laboratories Opera, Italien
- Genheimer GmbH Hettstadt, Deutschland
- GibcoBRL Life Technologies Karlsruhe/Eggenstein, Deutschland
- Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland
- Hartenstein Würzburg, Deutschland
- Heraeus Hanau, Deutschland
- Hoechst AG (Aventis) Frankfurt a.M., Deutschland
- Ingold (Merck Eurolab) Darmstadt, Deutschland
- Laborbedarf Schubert Wackersdorf, Deutschland
- Leica Microsystems AG Wetzlar, Deutschland
- Liebherr Hausgeräte GmbH Ochsenhausen, Deutschland
- Merck Eurolab (VWR International Inc.) Darmstadt, Deutschland
- Millipore GmbH Eschborn, Deutschland
- New Brunswick Scientific New Brunswick, NJ, USA
- Nunc Wiesbaden-Biebrich, Deutschland
- Olympus Optical GmbH Hamburg, Deutschland
- PharMingen (BD Biosciences) Heidelberg, Deutschland; San Diego, CA, USA
- Privileg, Quelle AG Fürth, Deutschland
- Sarstedt Nürnbergrecht, Deutschland
- Sartorius Göttingen, Deutschland
- Schleicher & Schuell GmbH Dassel, Deutschland
- Schott-Glas Mainz, Deutschland
- Sigma Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- Stiefenhofer C. GmbH Peiting, Deutschland

B.2 Methoden

B.2.1 Gewinnung und Aufreinigung der CD4⁺-T-Lymphozyten

Lymphknotenentnahme: 6-8 Wochen alte Mäuse (siehe Abschnitt B.1.6) wurden durch Genickbruch getötet, und Lymphknoten cervical, axillär, inguinal, paraaortal und mesenterial unter einer Sterilbank entnommen. Die Lymphknoten wurden kurzfristig mit Ethanol (70 Volumen-%) benetzt, bevor sie in sterile Gewebekulturschalen mit RPMI 1640 (4° C, auf Eis) überführt wurden.

Zellgewinnung: Anschließend wurden die Lymphknoten unter Spülung mit RPMI 1640 durch ein Zellsieb (70 µm) gerieben, das Eluat wurde 7 min zentrifugiert (200 x g, 4° C), anschließend in 2 ml PBS mit 2 % FCS resuspendiert und die Zelldichte (ca. 2×10^7 /ml) mittels Zählkammer (Trypanblau-Färbung) bestimmt.

Aufreinigung: Nach zugehöriger Anleitung erfolgte im unmittelbaren Anschluss die Aufreinigung zur Gewinnung der CD4⁺-T-Zellen über Säulenchromatographie (jeweils eigene Säule pro Maus) mit Hilfe des "Mouse CD4 Cell Recovery Column Kit CL111-5" unter weiterhin sterilen Bedingungen, wobei als Puffer PBS mit 2 % FCS (die Zugabe von FCS erhöht die Ausbeute an CD4⁺-Zellen) verwendet wurde.

Das Eluat der Säulenchromatographie wurde im letzten Waschschrift in Experiment A mit 'komplettem RPMI 1640' und in Experiment B mit 'komplettem X-VIVO 15' Medium aufgenommen. Im Weiteren ist bei der unspezifizierten Verwendung des Begriffes 'Medium' je nach Experiment A oder B das entsprechende, eben genannte Substrat gemeint.

B.2.2 Stimulation und Expansion

Vorbereitung: Zur Vorbereitung der T-Zell-Stimulation wurden Gewebekulturplatten mit αCD3-Antikörpern beschichtet. Dazu wurden diese Platten nach folgendem Schema mit jeweils 1 ml der entsprechenden Antikörperlösung (in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5) pro Kavität beschickt: Zuerst Inkubation mit dem *ersten* Antikörper (aus Ziege) gegen Armenisches-Hamster-IgG (= αHam, 30 µg/ml), der an den Plattenboden bindet, für 24 h bei 4° C unter leichtem Schütteln. Dann Entfernen des Überstandes, zweimaliges Waschen mit RPMI-1640-Medium. Nun erneute Inkubation über 24 h bei 4° C unter leichtem Schütteln nach Zugabe des *zweiten* Antikörpers (aus armenischem Hamster)

gegen murines CD3 ($5 \mu\text{g/ml}$)², der durch den ersten Antikörper am Plattenboden fixiert wird. Schließlich erneutes Entfernen des Überstandes und zweimaliges Waschen mit RPMI 1640.

Stimulation: Auf die so mit αCD3 beschichteten Gewebekulturplatten wurden die CD4^+ -T-Zellen (ca. 10^7 pro verwendeter Maus) überführt ($500 \mu\text{l}$ mit ca. 10^5 - 10^6 Zellen pro Kammer) und 3 Tage mit löslichem αCD28 -Antikörper ($10 \mu\text{g/ml}$ in entsprechendem 'Medium' je nach Experiment A oder B) unter Zusatz von rekombinantem IL-2 (100 pg/ml) stimuliert (37°C , 5 % CO_2 -Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit). Zwischenzeitlich Ergänzung von 'Medium' mit IL-2 in der ursprünglich zugegebenen Konzentration.

Expansion: Nach 3 Tagen dann Überführung der Zellen aus je 2 Kammern in ein 50-ml-Röhrchen, Nachspülen mit je 1 ml 'Medium' pro Kammer und Zugabe von 10 ml 'Medium'. Dann Zentrifugieren ($200 \times \text{g}$, 5 min, RT) und Resuspendieren des Zell-Pellets in 2 ml 'Medium'. Zugabe von IL-2 in der initialen Konzentration (100 pg/ml). Nach Ausbringen von je $500 \mu\text{l}$ pro Kavität Expansion der Zellen über 4 weitere Tage (37°C , 5 % CO_2 -Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit). Zwischenzeitlich täglich Ergänzung von 'Medium' mit IL-2 in der ursprünglichen Konzentration und einmaliges 'Splitten' der Zellen von jeweils einer auf je zwei Kammern.

B.2.3 Induktion und Messung der Apoptose

Vorbereitung: Zur Vorbereitung der Apoptose-Induktion wurden, wie im ersten Absatz des letzten Abschnittes beschrieben, Gewebekulturplatten teils mit αCD3 - und teils mit αFas -Antikörpern (jeweils gebunden über αHam -Antikörper) beschichtet (s. Abschnitt B.2.2).

Induktion: Aus je zehn Kammern wurden die Zellen 'geerntet', in ein 50-ml-Röhrchen überführt und mit RPMI 1640 bis auf 25 ml aufgefüllt. Dann erfolgten die Bestimmung der Zelldichte (Zählkammer), einmaliges Waschen ($200 \times \text{g}$, 5 min, RT) und Einstellen der Zelldichte auf ca. $10^6/\text{ml}$ durch Zugabe von RPMI 1640 (auf ca. 45-50 ml). Anschließend wurden die Zellen auf den vorbereiteten Gewebekulturplatten ausgebracht (pro Kavität $500 \mu\text{l}$, ca. 10^5 Zellen/ml), so dass für jede Zellart (d.h. für jede Maus mit unterschiedlichem 'Knock-out'-Grad) und für jeden Messzeitpunkt (6 h, 12 h, 24 h und 48 h) jeweils die unterschiedlichen Induktionsarten der Apoptose (keine, nur αHam , αFas (bei Expe-

²oder zur Apoptoseinduktion später (siehe ersten Absatz in B.2.3) analog statt αCD3 - mit αFas -Antikörpern in derselben Konzentration

riment A) und α CD3) vorgenommen wurden, also in Experiment A $4 \times 4 \times 4 = 64$ und in Experiment B $3 \times 4 \times 3 = 36$ Kammern befüllt wurden.

Färben: Zu den angegebenen Zeitpunkten (jeweils 6, 12, 24 bzw. 48 h nach Induktionsbeginn) wurden dann aus der entsprechenden Kammer die zugehörigen Zellen ‘geerntet’ und erst mit kaltem PBS und dann mit Annexin-V-Bindepuffer gewaschen ($200 \times g$, 5 min, RT). Danach wurden die Zellrückstände mit je $2,5 \mu\text{l}$ Annexin-V (und bei Experiment B zeitgleich mit derselben Menge an 7-AAD) für 15 min inkubiert (RT, im Dunkeln), bevor dann $250 \mu\text{l}$ Annexin-Bindepuffer zugegeben wurden.

Messung: Die ‘gefärbten’ Zellen wurden in spezielle FACS-Röhrchen überführt und am FACScan (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) gemessen. Dabei wurden ohne Verwendung eines ‘Gates’ bei Ringstellung ‘6’ pro Röhrchen 20.000 Zellen analysiert und die Parameter FSC-H, SSC-H, FL2-H (orange, 542-585 nm) und FL3-H (rot, >650 nm) aufgezeichnet.

Die weitere Auswertung erfolgte mittels der Software ‘Cellquest’ (Macintosh-Computer), teilweise ergänzt durch die ‘Freeware’ WinMDI 2.5 (IBM-PC), und wurde in Kapitel 3, speziell im Abschnitt 3.1 beschrieben.

Anhang C

Abkürzungsverzeichnis

- \uparrow Zunahme
- \downarrow Abnahme
- \approx ungefähr (gleich) (viel)
- $+/+$ homozygot bei Vorliegen beider Allele
- $-/+$ heterozygot bei Vorliegen nur eines Allels
- $-/-$ homozygot bei Fehlen beider Allele des so gekennzeichneten Gens
- α alpha; Anti-
- α CD3 Antikörper gegen CD3 (ϵ -Untereinheit) der Maus
- α Fas Antikörper gegen Fas der Maus
- α Ham AK gegen armenisches-Hamster-IgG (adhäriert an Kunststoff)
- 7-AAD 7-Amino-Actinomycin D (färbt nekrotische Zellen)
- Abb. Abbildung
- AG Antigen
- AICD Activation Induced Cell Death
- AK Antikörper
- Annexin-V färbt apoptotische Zellen
- AP-1 Activator Protein 1
- APC professionelle Antigen-präsentierende Zelle
- APO-1 = Fas = CD95
- BSA Bovine Serum Albumine (Rinder-Serum-Albumin)
- $^{\circ}\text{C}$ Grad Celsius

ANHANG C. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- ca. circa
- Caspase Cystein-Aspartase
- CD Cluster of Differentiation
- CD95 (Fas) CD95 (Rezeptor)
- CD95L (FasL) CD95-Ligand (Fas-Ligand)
- CsA Cyclosporin A
- d Tag(e)
- DAG Diazylglyzerin
- DNA Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
- FACS Fluorescence Activated Cell Sorter (Durchflußzytometer)
- Fas Fas-Rezeptor (= CD95)
- FasL Fas-Ligand (= CD95-Ligand)
- FCS Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
- FL1-3 Fluoreszenz Typ 1-3 (unterschiedliche Frequenzbereiche)
- FL2-H FL2-Height (hoch → Annexin-V gebunden → Apoptose)
- FL3-H FL3-Height (hoch → 7-AAD gebunden → Nekrose)
- FSC forward scatter (Vorwärts-Streulicht)
- FSC-H FSC-Height (hoch → große Zellen)
- g Gramm; mit vorangestelltem Multiplikator (z.B. 200 x): Erdbeschleunigung
- ggf. gegebenenfalls
- h Stunde(n)
- H Height (z.B. FSC-H oder FL2-H)
- HEPES N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
- i.d.R. in der Regel
- IFN γ Interferon Gamma
- Ig Immunglobulin
- IKK I κ B-Kinase
- IL Interleukin
- IL-2-R Interleukin-2-Rezeptor
- inkl. inklusive

ANHANG C. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- IP_3 Inositoltrisphosphat
- IU internationale Einheiten
- kDa kilo-Dalton
- lck lymphoid T cell protein tyrosine kinase
- k.o. knock out
- MHC Haupthistokompatibilitätskomplex
- min Minute(n)
- ml Milliliter
- μ l Mikroliter
- mM millimolar
- mRNA Messenger-RNA (Boten-RNA)
- MW Mittelwert
- NFAT Nuclear factor of activated T cells
- $NF\kappa B$ Nukleärer Transkriptionsfaktor κB
- nm Nanometer
- p Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art (Signifikanzniveau)
- PCR Polymerase-Ketten-Reaktion
- pg Picogramm
- PIP_2 Phosphatidylinositolbisphosphat
- Reg. regulatorischer Bereich (im NFAT-Gen)
- RNA Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
- RSD Rel-similarity domain
- RT Raumtemperatur
- s. siehe
- S. Seite(n)
- σ Standardabweichung (Quadratwurzel der Varianz)
- $\bar{\sigma}$ Standardfehler
- sog. sogenannt(e)
- SP Serin/Prolin-Phosphorylierungsbereich
- SSC sideward scatter (Seitwärts-Streulicht)

ANHANG C. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- SSC-H SSC-Height (hoch → hohe Granularität)
- Tab. Tabelle
- TAD Transaktivierungsdomäne
- TNF Tumornekrosefaktor
- TNFR1 Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
- TCR T-Zell-Rezeptor
- well Kammer (Kavität) einer Zellkulturplatte
- wt wildtyp oder wildtypisch
- ZAP-70 ζ -assoziiertes Protein von 70 kDa

Literaturverzeichnis

- [1] P.R. BEVINGTON, D.K. ROBINSON: *Data reduction and error analysis for the physical sciences*. McGraw-Hill Inc., 1992 (2. Auflage)
- [2] EINHEITSÜBERSETZUNG: *Die Bibel*. Katholische Bibelanstalt GmbH (1980) Joh 12, 25
- [3] P.B. BUSHDID, H. OSINSKA, R.R. WACLAW, J.D. MOLKENTIN, K.E. YUTZEY: *NFATc3 and NFATc4 are Required for Cardiac Development and Mitochondrial Function*. *Circulation Research* **92** (2003) 1305 ff
- [4] K. CANTE-BARRETT, E.M. GALLO, M.M. WINSLOW, G.R. CRABTREE: *Thymocyte negative selection is mediated by protein kinase C- and Ca²⁺-dependent transcriptional induction of bim [corrected]*. *J. Immunol.* **176** (2006) 2299-2306
- [5] S. CHUVPILO, E. JANKEVICS, D. TYRSIN, A. AKIMZHANOV, D. MOROZ, M.K. JHA, J. SCHULZE-LUEHRMANN, B. SANTNER-NANAN, E. FOEKTISTOVA, T. KÖNIG, A. AVOTS, E. SCHMITT, T. BERBERICH-SIEBELT, A. SCHIMPL, E. SERFLING: *Autoregulation of NFATc1/A Expression Facilitates Effector T Cells to Escape from Rapid Apoptosis*. *Immunity* **16** (2002) 881-895
- [6] R.S. COTRAN, V. KUMAR, T. COLLINS: *Robbins pathologic basis of disease*. W.B. Saunders Company, 1999 (6. Auflage)
- [7] L. GENESTIER, N. BONNEFOY-BERNARD, J.-P. REVILLARD: *Apoptosis of Activated Peripheral T Cells*. *Transplantation Proceedings* **31 Suppl. 1/2A** (1999) 33-38
- [8] K. GOLENHOFEN: *Physiologie*. Urban & Schwarzenberg, 1997

LITERATURVERZEICHNIS

- [9] I.A. GRAEF, F. CHEN, L. CHEN, A. KUA, G.R. CRABTREE: *Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature*. Cell **105** (2001) 863-875
- [10] I.A. GRAEF, F. WANG, F. CHARRON, L. CHEN, J. NEILSON, M. TESSIER-LAVIGNE, G.R. CRABTREE: *Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons*. Cell **113(5)** (2003) 657-670
- [11] S.W. HETTS: *To Die or Not to Die*. JAMA **279(4)** (1998) 300-307
- [12] M.R. HODGE, A.M. RANGER, F.C. DE LA BROUSSE, T. HOEY, M.J. GRUSBY, L.H. GLIMCHER: *Hyperproliferation and Dysregulation of IL-4 Expression in NF-ATp-Deficient Mice*. Immunity **4** (1996) 397-405
- [13] C.A. JANEWAY, P. TRAVERS: *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1997 (2. Auflage)
- [14] D. KABELITZ, T. POHL, K. PECHHOLD: *Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes*. Immunology today **14(7)** (1993) 338-339
- [15] F.H. KAYSER, K.A. BIENZ, J. ECKERT, R.M. ZINKERNAGEL: *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme, 1997 (9. Auflage)
- [16] J.F.R. KERR, A.H. WYLLIE, A.R. CURRIE: *Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer **26** (1972) 239-257
- [17] A. KERSTAN, T. HÜNIG: *Cutting Edge: Distinct TCR- and CD28-Derived Signals Regulate CD95L, Bcl-x_L, and the Survival of Primary T Cells*. Journal of Immunology **172** (2004) 1341-1345
- [18] MARTY KEYSER: *Als Wendy's Bruder starb*. Reader's Digest "Das Beste", Ausgabe auch beim Verlag nicht mehr recherchierbar.
- [19] C. KLAS, K.M. DEBATIN, R.R. JONKER, P.H. KRAMMER: *Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells*. International Immunology **5(6)** (1993) 625-630

LITERATURVERZEICHNIS

- [20] E. KONDO, A. HARASHIMA, T. TAKABATAKE, H. TAKAHASHI, Y. MATSUO, T. YOSHINO, K. ORITA, T. AKAGI: *NF-ATc2 induces apoptosis in Burkitt's lymphoma cells through signalling via the B cell antigen receptor*. Eur. J. Immunol. **33**(1) (2003) 1-11
- [21] E. KONDO ET AL.: (*AICD nach BCR-Stimulation ist in NFATc1-defizienten DT40-Zellen deutlich erhöht*). In Vorbereitung
- [22] H. KOPKA: *L^AT_EX Band 1: Einführung*. Addison-Wesley, 1996
- [23] W. KÜHNEL: *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. Thieme, 1995 (9. Auflage), S. 75, Abb. 100
- [24] J. LANGMAN: *Medizinische Embryologie*. Thieme, 1989 (8. Auflage), Taschenbuch der gesamten Anatomie, Band 4
- [25] K.M. LATINIS, L.A. NORIAN, S.L. ELIASON, G.A. KORETZKY: *Two NFAT Transcription Factor Binding Sites Participate in the Regulation of CD95 (Fas) Ligand Expression in Activated Human T Cells*. The Journal of Biological Chemistry **272**(50) (1997) 31427-31434
- [26] M.J. LENARDO: *Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis*. Nature **353** (1991) 858-861
- [27] F. MACIAN, C. GARCIA-RODRIGUEZ, A. RAO: *Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun*. EMBO Journal **19**(17) (2000) 4783-4795
- [28] P.R. MITTELSTADT, J.D. ASHWELL: *Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr3 regulates Fas ligand expression*. Mol. Cell. Biol. **18** (1998) 3744-3751
- [29] P.R. MITTELSTADT, J.D. ASHWELL: *Role of Egr2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells*. J. Biol. Chem. **274** (1999) 3222-3227
- [30] M.A. MUSCI, K.M. LATINIS, G.A. KORETZKY: *Short Analytical Review: Signaling Events in T Lymphocytes Leading to Cellular Activation or Programmed Cell Death*. Clinical Immunology and Immunopathology **83** (1997) 205-222

LITERATURVERZEICHNIS

- [31] H. NISHINA, L. R DVANYI, K. RAJU, T. SASAKI, I. KOZIERADZKI, J.M. PENNINGER: *Impaired TCR-Mediated Apoptosis and Bcl-XL Expression in T Cells Lacking the Stress Kinase Activator SEK1/MKK4*. *Journal of Immunology* **161** (1998) 3416-3420
- [32] S.B. NULAND: *Wie wir sterben*. Droemersch Verlaganstalt Th. Knauer Nachf, 1996, S. 393
- [33] M. OUKKA, I.C. HO, F.C. DE LA BROUSSE, T. HOEY, M.J. GRUSBY, L.H. GLIMCHER: *The Transcription Factor NFAT4 Is Involved in the Generation and Survival of T Cells*. *Immunity* **9** (1998) 295-304
- [34] S.L. PENG, A.J. GERTH, A.M. RANGER, L.H. GLIMCHER: *NFATc1 and NFATc2 Together Control Both T and B Cell Activation and Differentiation*. *Immunity* **14** (2001) 13-20
- [35] A. PRZYBYLSKI: *Auswertung von Messungen und Fehlerrechnung*. Skriptum zur Vorlesung WS 1990/91
- [36] A.M. RANGER, M.R. HODGE, E.M. GRAVALLESE, M. OUKKA, L. DAVIDSON, F.W. ALT, F.C. DE LA BROUSSE, T. HOEY, M. GRUSBY, L.H. GLIMCHER: *Delayed Lymphoid Repopulation with Defects in IL4-Driven Responses Produced by Inactivation of NF-ATc*. *Immunity* **8** (1998) 125-134
- [37] A.M. RANGER, M. OUKKA, J. RENGARAJAN, L.H. GLIMCHER: *Inhibitory Function of Two NFAT Family Members in Lymphoid Homeostasis and Th2-Development*. *Immunity* **9** (1998) 627-635
- [38] A. RAO, C. LUO, P.G. HOGAN: *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. *Annu. Rev. Immunol.* **15** (1997) 707-747
- [39] J. RENGARAJAN, P.R. MITTELSTADT, H.W. MAGES, A.J. GERTH, R.A. KROCEK, J.D. ASHWELL, L.H. GLIMCHER: *Sequential Involvement of NFAT and Egr Transcription Factors in FasL Regulation*. *Immunity* **12** (2000) 293-300
- [40] D. RENNER, H. EXNER: *Original-Prüfungsfragen mit Kommentar GK2: Medizinische Biometrie*. Thieme, 1998 (10. Auflage)

LITERATURVERZEICHNIS

- [41] J.H. RUSSELL, B. RUSH, C. WEAVER, R. WANG: *Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (1993) 4409-4413
- [42] L. SACHS: *Angewandte Statistik*. Springer, 1999 (9.Auflage)
- [43] K. SCHUH, B. KNEITZ, J. HEYER, F. SIEBELT, C. FISCHER, E. JANKEVICS, E. RÜDE, E. SCHMITT, A. SCHIMPL, E. SERFLING: *NF-ATp plays a prominent role in the transcriptional induction of Th2-type lymphokines*. Immunology Letters **57** (1997) 171-175
- [44] K. SCHUH, B. KNEITZ, J. HEYER, U. BOMMARDT, E. JANKEVICS, F. BERBERICH-SIEBELT, K. PFEFFER, H.K. MÜLLER-HERMELINK, A. SCHIMPL, E. SERFLING: *Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice*. Eur. J. Immunol. **28** (1998) 2456-2466
- [45] J. SCHULZE-LÜHRMANN: *Die Hämatopoetische Progenitor Kinase (HPK)1 und NFAT-Transkriptionsfaktoren unterstützen die Apoptose von T-Lymphozyten*. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Würzburg, 2002
- [46] E. SERFLING, R. BARTHELMÄS, I. PFEUFFER, B. SCHENK, S. ZARIUS, R. SWOBODA, F. MERCURIO, M. KARIN: *Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes*. EMBO Journal **8** (1989) 465-473
- [47] E. SERFLING, F. BERBERICH-SIEBELT, S. CHUVPILLO, E. JANKEVICS, S. KLEINHESLING, T. TWARDZIK, A. AVOTS: *The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation*. Biochem. Biophys. Acta **1498** (2000) 1-18
- [48] E. SERFLING: Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe E. Serfling, Darstellung etwas vereinfacht.
- [49] E. SERFLING: Private Kommunikation (u.a. mittels email).
- [50] E. SERFLING, S. KLEINHESLING, A. PALMETSHOFER, T. BOPP, M. STASSEN, E. SCHMITT: *NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance*. Eur. J. Immunol. **36** (2006) Vorabdruck des Autors

LITERATURVERZEICHNIS

- [51] J.P. SHAW, P.J. UTZ, D.B. DURAND, J.J. TOOLE, E.A. EMMEL, G.R. CRABTREE: *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science **241** (1988) 202-205
- [52] Y.F. SHI, B.M. SAHAI, D.R. GREEN: *Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes*. Nature **339** (1989) 625-626
- [53] R.K. SRIVASTAVA, C.Y. SASAKI, J.M. HARDWICK, D.L. LONGO: *Bcl-2-mediated Drug Resistance: Inhibition of Apoptosis by Blocking Nuclear Factor of Activated T Lymphocytes (NFAT)-induced Fas Ligand Transcription*. J. Experimental Medicine **190(2)** (1999) 253-265
- [54] H.K. SYTWU, R.S. LIBLAU, H.O. MCDEVITT: *The Roles of Fas/APO-1(CD95) and TNF in Antigen-Induced Programmed Cell Death in T Cell Receptor Transgenic Mice*. Immunity **5** (1996) 17-30
- [55] D.S. UCKER, J. MEYERS, P.S. OBERMILLER: *Activation-driven T cell death: Quantitative Differences Alone Distinguish Stimuli Triggering Nontransformed T Cell Proliferation or Death*. The Journal of Immunology **149(5)** (1992) 1583-1592
- [56] L. VAN PARIJS, A.K. ABBAS: *Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes off*. Science **280** (1998) 243-248
- [57] L. VAN PARIJS, Y. REFAELI, J.D. LORD, B.H. NELSON, A.K. ABBAS, D. BALTIMORE: *Uncoupling Il-2 Signals that Regulate T Cell Proliferation, Survival, and Fas-Mediated Activation-Induced Cell Death*. Immunity **11** (1999) 281-288
- [58] M. ZEILINGER, W. HÜBL: *Durchflusszytometrie – eine Einführung*. www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie.htm

Danksagung

Ich möchte meinem ‘Doktorvater’ Herrn Professor Dr. Dr. Edgar Serfling danken, seine unkomplizierte und kompetente Art hat nicht nur den *Einstieg* in die völlig neue Welt der Laborarbeit erleichtert und motiviert. Auch auf dem gesamten, teils verschlungenen Weg bis zur endgültigen Fertigstellung dieser Arbeit hat er mich stets tatkräftig unterstützt.

Dr. Andris Avots war als direkter Betreuer meines Projektes die treibende und lenkende Kraft dieser Arbeit. Sein Engagement und sein profundes Wissen waren ausschlaggebend, das gesteckte Ziel zu erreichen.

Die Hilfe von Jan Schulze-Lührmann¹ war in allen praktischen und vielen theoretischen Fragen unverzichtbar. Er hat mein Leben im Labor freundschaftlich begleitet, auch der nicht-wissenschaftliche Teil kam dabei glücklicherweise nicht zu kurz.

Ohne die Hilfe und Mitwirkung aller Mitglieder von Professor Serflings Arbeitsgruppe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, dafür herzlichen Dank. Insbesondere Dr. Thomas Twardzik war durch die Kreuzung der Knock-out-Mäuse und die Leitung des zugehörigen Mausstalles maßgeblich am Gelingen dieses Projektes beteiligt.

Meine Familie hat mich zu dem gemacht, was ich bin. Ich verdanke ihnen alles. Ich widme diese Arbeit meinem verstorbenen Vater, der lange vor ihrer Fertigstellung seinem Krebsleiden erlag. Sein Mut und seine Wärme sind und waren immer Vorbild für mich.

Meine Frau Corinne, die ich während dieser Laborarbeit kennen und lieben lernte, hat mir gezeigt, wie eng Licht und Schatten beieinander liegen können. Sie ist das Licht meines Lebens. Unser Sohn Julian ist Krönung und Zentrum unseres Glücks.

Diese schriftliche Form meiner Arbeit wurde mit L^AT_EX 2_ε unter häufiger Benutzung von [22] erstellt.

¹inzwischen Dr. Jan Schulze-Lührmann

Lebenslauf



- Name:* **König, Thomas Hermann**
- Adresse:* Bürgermeister-Seubert-Straße 15
97204 Höchberg
- Telefon:* (09 31) 46 79 8 79
- Geburt:* 08. August 1969 in Würzburg
- Nationalität:* deutsch
- Familienstand:* verheiratet, 1 Sohn
- Schulbildung:* 1976 – 1980 Goethe-Grundschule, Würzburg
1980 – 1989 Schönborn-Gymnasium, Würzburg:
Allgemeine Hochschulreife (Note 1.0)
- Stipendium:* 30.05.1989 Erfolgreiche Teilnahme an der Prüfung für das
Stipendium für Hochbegabte (gem. BayBFG)
- Zivildienst:* 04.09.1989 – 30.11.1990
Missionsärztliche Klinik, Würzburg (Pflegedienst)
- Studium der Physik (Diplom):* WS 1990/91 – SS 1993
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
02.11.1992 Vordiplom Physik (mit Auszeichnung)
Fall 1993 – Spring 1994
State University of New York at Stony Brook
15.05.1994 Master of Arts (Major: Physics)
WS 1994/95 – WS 1996/97
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Diplomarbeit am Institut für Theoretische Physik:
"The Statistical Physics of the Knapsack Problem"
20.01.1997 Diplom Physik (mit Auszeichnung)
- Studium der Humanmedizin:* SS 1997 – WS 2003
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/1999 Ärztliche Vorprüfung (Note: 1.0)
03/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2)
ab 05/2000 Doktorarbeit am Pathologischen Institut:
"Die Rolle von NFAT-Transkriptionsfaktoren bei
der Regulation der Apoptose peripherer T-Zellen"
bei Prof. Dr. Dr. E. Serfling
09/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2)

LEBENS LAUF

10/2002 – 10/2003 Praktisches Jahr an der
Universitätsklinik Würzburg (Wahlfach Kinderheilkunde)
11/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1)

Arzt im Praktikum: 01/2004 – 09/2004
Universitäts-Kinderklinik Würzburg (Prof. Dr. Ch. P. Speer)

Approbation: ab 01.10.2004 Assistenzarzt an der
Universitäts-Kinderklinik Würzburg (Prof. Dr. Ch. P. Speer)

Wissenschaft: 01/2001 Promomed-Kongress, Würzburg
Vortrag zum Thema “NF-AT-Transkriptionsfaktoren kontrollieren
die Apoptose peripherer T-Zellen”

04/2002 Biochemica et Biophysica Acta 2002 Oct 9; 1588(1): 41-47
Mitautorschaft von “The CD23b promoter is a target
for NF-AT transcription factors in B-CLL cells”

06/2002 Immunity Vol. 16(6), 881-895
Mitautorschaft von “Autoregulation of NFATc1/A expression
facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis”

Würzburg, 12. Juli 2007

